

Untersuchungen zur Funktion der
6-O-Endosulfatasen, Sulf1 und Sulf2,
während der Skelettentwicklung am Mausmodell

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

des Fachbereichs
Biologie und Geographie
an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Andreas Ratzka

aus Rodewisch

Dezember 2008

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Andrea Vortkamp

2. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Mundlos

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Peter Bayer

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Juli 2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das Säugetierskelett	1
1.2. Die Knochen- und Knorpelbildung	2
1.3. Die molekulare Steuerung der endochondralen Ossifikation	5
1.3.1. Der Ihh/PTHrP-Signalweg	6
1.3.2. Der FGF-Signalweg	7
1.3.3. Der Wnt-Signalweg	8
1.4. Heparansulfat-Proteoglykane	9
1.5. Die Sulfatase-Genfamilie der Säugetiere	11
1.6. Heparansulfat-6-O-Endosulfatasen	13
1.7. Zielsetzung der Arbeit	15
2. Materialien und Methoden	16
2.1. Molekularbiologische Methoden	16
2.1.1. Isolierung von genomischer DNA zur Genotypisierung	16
2.1.2. Isolierung von DNA	16
2.1.3. Isolierung von Gesamt-RNA	16
2.1.4. Reverse Transkription	16
2.1.5. Standard-PCR und DNA-Sequenzierung	17
2.1.6. Quantitative RT-PCR	17
2.1.7. Klonierung von Arsl, Sulf1 und Sulf2 Expressionskonstrukten	18
2.1.7.1. pcDNA3.1/V5-His Expressionskonstrukte	18
2.1.7.2. Arsl-RCAS Konstrukt	19
2.1.8. Sulf1 und Sulf2 Peptid-Antikörper	19
2.1.9. SDS-PAGE und Western blot	19
2.2. Histologie und Skelettpräparation	20
2.2.1. Paraffinschnitte	20
2.2.2. Histologische Färbungen	21
2.2.3. Bestimmung der Proliferationsrate	21
2.2.4. β -Gal-Färbung	22
2.2.5. Knorpel- und Knochenfärbung von Skelettpräparationen	22
2.3. In situ-Hybridisierung	22
2.3.1. DNA-Templates der antisense-RNA Sonden	23
2.3.2. ISH an Paraffin Gewebeschnitten	25
2.3.3. ISH an ganzen Embryonen (WISH)	26
2.4. Genetrap-Mausmutanten	27
2.4.1. Sulf1 ^{gt} und Sulf2 ^{gt} Mausmutanten	28
2.4.2. Bestimmung der Genetrap-Vektor Integrationsstelle	29
2.5. Überexpressions-Mausmutanten	29
2.5.1. Col2a1-Sulf1 und Col2a1-Sulf2 Mausmutanten	29
2.5.2. Bestimmung der Col2-Sulf1 ^{tg199} Integrationsstelle	30
2.6. Genotypisierung der Mausmutanten	31
2.6.1. Col2-Sulf1 Genotypisierung	31
2.6.2. Col2-Sulf2 Genotypisierung	31
2.6.3. Shh Genotypisierung	31
2.6.4. Sulf1 ^{gt} Genotypisierung	32
2.6.5. Sulf2 ^{gt} Genotypisierung	32
2.7. Zellkultur	32
2.8. RCAS-Arsl Produktion und Injektion in Hühnerembryonen	33
2.9. Materialien	34

2.9.1. Reagenzien	34
2.9.2. Lösungen.....	35
2.9.3. Vektoren und Plasmide	35
2.9.4. Oligonukleotid-Primer	37
2.9.5. Zelllinien	39
2.9.6. Organismen.....	40
2.9.7. Datenbanken und Software	40
3. Ergebnisse.....	41
3.1. Unterteilung der Sulfatase-Genfamilie	41
3.1.1. Expressionsmuster der Sulfatasen im Mäusembryo.....	42
3.1.2. Sulfatasen im Knorpel und Knochen	45
3.1.3. Expression von <i>Ars1</i> , <i>Sulf1</i> und <i>Sulf2</i> im Embryo	48
3.1.4. Expression von <i>Sulf1</i> und <i>Sulf2</i> im embryonalen Skelett	49
3.2. Die Sulf1- und Sulf2-Genetrap Mausmutanten	52
3.2.1. Lokalisation der Genetrap Integration im Genom	52
3.2.2. Reportergen-Expression bei Sulf1 ^{gt} und Sulf2 ^{gt} Embryonen	53
3.2.3. Sulf1 ^{gt} und Sulf2 ^{gt} sind hypomorphe Allele	54
3.2.4. Sulfatasen und Sulfotransferasen in Sulf1 ^{gt} und Sulf2 ^{gt} Mutanten.....	56
3.2.5. Das Sulf2 Protein ist in Sulf2 ^{gt/gt} Mutanten nicht detektierbar	57
3.3. Skelettphänotyp der Sulf1 und Sulf2 Mausmutanten	59
3.3.1. Reduziertes Körpergewicht bei Sulf1;Sulf2 Doppelmutanten	60
3.3.2. Reduzierte Skelettgröße bei Sulf1;Sulf2 Doppelmutanten.....	61
3.3.3. Skelettfehlbildungen bei Sulf1;Sulf2 Doppelmutanten	63
3.3.4. Verkürzte proliferierende Zone im Radius	68
3.3.5. Verkürzte proliferierende Zone im Sternum.....	71
3.4. Skelettphänotyp der Shh;Sulf1;Sulf2 Dreifachverkreuzung.....	72
3.5. Sulf1 und Sulf2 Überexpressions-Mausmutanten	75
3.5.1. Skelettphänotyp der Überexpressions-Mausmutanten	75
3.5.2. Verifizierung der Col2a1-Sulfatase Überexpression	79
3.5.3. Identifizierung der chromosomalen tg199-Integrationsstelle	81
3.5.4. Col2a1-Sulf1 ^{tg199} trägt eine 2,25 Mb Deletion auf Chromosom 15	83
3.5.5. Expressionsmuster der auf Chromosom 15 deletierten Gene	85
3.6. Arsl-Überexpression im Hühnerembryo	86
4. Diskussion	88
4.1. Die Sulfatase-Genfamilie	88
4.1.1. Gen-Expression der Sulfatasen im Mäuse-Embryo.....	88
4.1.2. Gen-Expression von <i>Sulf1</i> und <i>Sulf2</i> im embryonalen Skelett	90
4.1.3. Bedeutung von Sulfatasen für die Skelettentwicklung	91
4.1.3.1. Störung der Autophagozytose	92
4.1.3.2. Störung des FGF-Signalwegs	93
4.1.3.3. Andere Störungen der Ossifikation.....	93
4.1.3.4. Mögliche Funktion der Arsl und ArslJ	93
4.2. Sulf1 und Sulf2 <i>loss of function</i> Mausmutanten	94
4.2.1. Skelettphänotyp der Sulf1;Sulf2 Mausmutanten.....	94
4.2.2. Weitere Sulf1 und Sulf2 <i>loss of function</i> Allele	95
4.2.3. Einfluss von Heparansulfaten auf die Ossifikation.....	97
4.2.4. Einfluss von Heparansulfaten auf die skeletale Musterbildung.....	99
4.2.5. Wechselwirkungen von Heparansulfat modifizierenden Enzymen	100
4.3. Col2-Sulf1 und Col2-Sulf2 transgene Mäuse	102
4.3.1. Mauslinie Col2-Sulf1 ^{tg199} trägt eine Deletion auf Chromosom 15	103
4.3.2. Kandidatengene für den Col2-Sulf1 ^{tg199} Phänotyp	104

5. Zusammenfassung	108
6. Summary	109
7. Literaturverzeichnis	110
8. Anhang	120
8.1. Proteinsequenzen des konservierten Bereichs der Sulfatasen	120
8.2. DNA-Sequenzen der IMAGE clone und ISH-Sonden Templates	121
8.2.1. Arsl cDNA-Sequenz (IC 2802810)	121
8.2.2. Sulf1 cDNA-Sequenz (IC 4500954)	122
8.2.3. Sulf2 cDNA-Sequenz (IC 3155559)	123
8.2.4. Template DNA-Sequenz der ArsA ISH-Sonde #11	124
8.2.5. Template DNA-Sequenz der ArsB ISH-Sonde #41	124
8.2.6. Template DNA-Sequenz der ArsC ISH-Sonde #04	125
8.2.7. Template DNA-Sequenz der ArsE ISH-Sonde #43	125
8.2.8. Template DNA-Sequenz der ArsG ISH-Sonde #16	125
8.2.9. Template DNA-Sequenz der ArsJ ISH-Sonde #52	126
8.2.10. Template DNA-Sequenz der ArsK ISH-Sonde #20	126
8.2.11. Template DNA-Sequenz der Galns ISH-Sonde #13	127
8.2.12. Template DNA-Sequenz der Gns ISH-Sonde #54	127
8.2.13. Template DNA-Sequenz der Ids ISH-Sonde #03	128
8.2.14. Template DNA-Sequenz der Sgsh ISH-Sonde #18	128
8.2.15. Template DNA-Sequenz der Angpt1 ISH-Sonde #85	129
8.2.16. Template DNA-Sequenz der Eif3s6 ISH-Sonde #86	129
8.2.17. Template DNA-Sequenz der Rspo2 ISH-Sonde #78	129
8.2.18. Template DNA-Sequenz der Tmem74 ISH-Sonde #79	130
8.2.19. Template DNA-Sequenz der Trhr ISH-Sonde #87	130
8.2.20. Template DNA-Sequenz der Ttc35 ISH-Sonde #88	130
8.2.21. Template DNA-Sequenz der DispA ISH-Sonde #05	131
8.3. DNA-Sequenz der RCAS-ArsI-V5 Klonierungsstelle	131
8.4. DNA-Sequenzen der Vektor Integrationsstellen	132
8.4.1. Sulf1 ^{gt} XM190 in Intron 1	132
8.4.2. Sulf2 ^{gt} PST111 in Intron 3	132
8.4.3. Col2-Sulf1 ^{tg199} auf Chromosom 15	132
8.4.3.1. Col2-Sulf1 ^{tg199} 3'-iPCR	132
8.4.3.2. Col2-Sulf1 ^{tg199} 5'-iPCR	133
8.4.3.3. Col2-Sulf1 ^{tg199} 42Mb-iPCR	133
8.5. Übersicht der Sulf1 ^{gt} und Sulf2 ^{gt} Genotypen	134
9. Verzeichnisse	135
9.1. Abkürzungsverzeichnis	135
9.2. Abbildungsverzeichnis	137
9.3. Tabellenverzeichnis	139
9.4. Publikationsverzeichnis	140
10. Danksagung	141
11. Lebenslauf	142
12. Erklärungen	143

1. Einleitung

1.1. Das Säugetierskelett

Das Skelett der Säugetiere besteht aus über 200 einzelnen Knochen und erfüllt verschiedene Funktionen. Es übernimmt Stützfunktionen, den Schutz der inneren Organe, und ermöglicht als Gegenspieler zur Muskulatur die (Fort-)Bewegung. Außerdem dient es als Mineralspeicher für Calcium- und Phosphat-Ionen und beherbergt im Knochenmark das blutbildende System. Anatomisch ist das Skelett in Schädel, Axialskelett (Wirbelsäule und Rippen), Extremitäten und Extremitätengürtel (Schulter- und Beckengürtel) unterteilt.

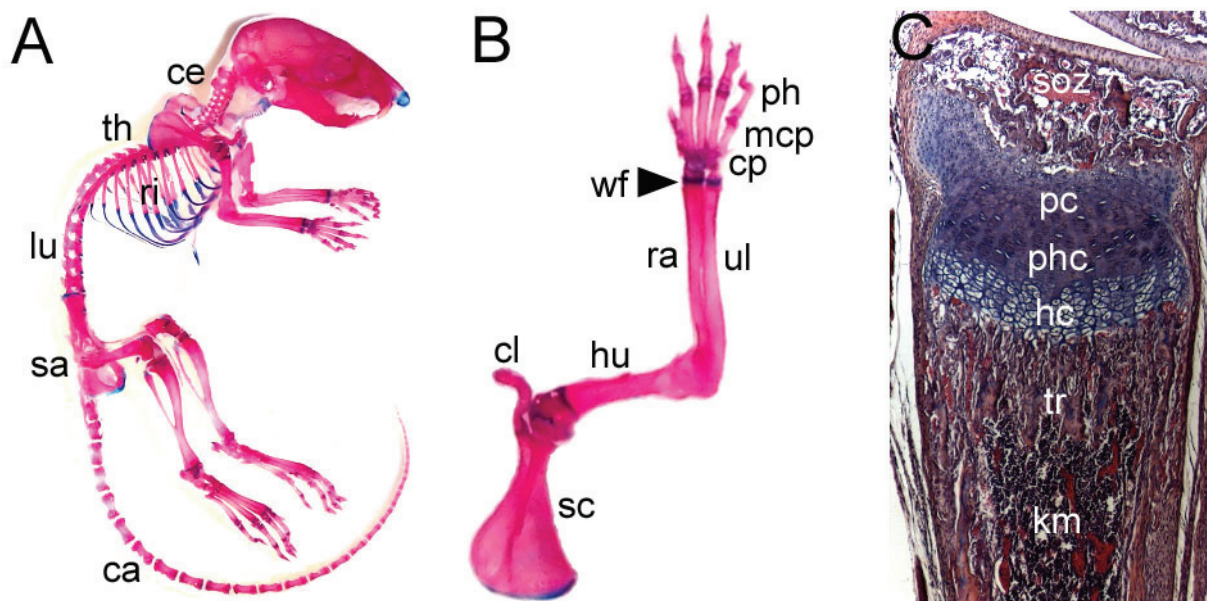


Abb. 1.1: Makro- und mikroskopischer Aufbau des Skeletts der Maus.

(A) Skelettpräparation einer 21 Tage alten Maus (P21). Durch die Färbung mit Alcianblau und Alizarinrot lassen sich die blau angefärbten Knorpelgewebe, z.B. die ventralen Abschnitte der Rippen (ri), gut von den rot angefärbten mineralisierten Geweben (Knochen) unterscheiden. Die einzelnen Wirbelgruppen des Axialskeletts werden als cervical (ce), thorakal (th), lumbal (lu), sakral (sa) und caudal (ca) bezeichnet. **(B)** Vergrößerte Darstellung der Vorderextremität mit Schultergürtel. Die einzelnen Skelettelemente werden von proximal nach distal (im Bild von unten nach oben) als Scapula (sc), Clavicula (cl), Humerus (hu), Radius (ra), Ulna (ul), Carpus (cp), Metacarpus (mcp) und Phalangen (ph) bezeichnet. Die Pfeilspitze markiert die knorpelige Wachstumsfuge (wf). **(C)** Mikroskopische Aufnahme eines Hämatoxylin/Eosin gefärbten Längsschnittes durch den distalen Teil des Radius (P14). Die Alcianblau angefärbte Wachstumsfuge lässt sich morphologisch in drei Zonen unterteilen; proliferierende Chondrozyten (pc), prähypertrophe Chondrozyten (phc) und hypertrophe Chondrozyten (hc). Weiterhin ist an diesem Präparat das sekundäre Ossifikationszentrum (soz), der trabekuläre Knochen (tr) und das Knochenmark (km) gekennzeichnet.

Die Wirbelsäule der Maus (*Mus musculus*) besteht aus 7 Hals- (Cervical-), 13 Brust- (Thorakal-), 6 Lenden- (Lumbal-), 4 Kreuz- (Sakral-) und ungefähr 30 Schwanz-

(Caudal-) Wirbeln. Seitlich an die Brustwirbel schließen sich die Rippen (Costae) an (Abb. 1.1A). Die ersten sieben Rippenpaare sind ventral mit dem Brustbein (Sternum) verwachsen, während die nachfolgenden Rippen frei enden. Der aus Schlüsselbein (Clavicula) und Schulterblatt (Scapula) bestehende Schultergürtel verbindet die Wirbelsäule mit der Vorderextremität. Diese besteht aus dem Oberarmknochen (Humerus), den beiden Unterarmknochen Elle (Ulna) und Speiche (Radius), sowie den Knochen der Handwurzel (Carpus), Mittelhand (Metacarpus) und der Fingerglieder (Phalangen) (Abb. 1.1B; Kaufmann, 1992).

1.2. Die Knochen- und Knorpelbildung

Die Knochen sollten nicht als starres unveränderliches Gerüst, sondern vielmehr als ein Gewebe aus lebenden Zellen (Osteoblasten und Osteoklasten) und einer von diesen Zellen ständig auf- bzw. abgebauten mineralisierten Interzellulärsubstanz (extrazelluläre Matrix) betrachtet werden. Die stetig stattfindenden Umbauprozesse dienen zum einen der Anpassung auf veränderte mechanische Belastung des Knochens. Zum anderen dienen sie der Homeostase des Calciumspiegels durch die Freisetzung bzw. Einlagerung von Calciumionen. Die Synthese der Knochensubstanz (Matrix-Mineralisierung) erfolgt durch spezialisierte Zellen, die als Osteoblasten bezeichnet werden. Diese Zellen scheiden eine hauptsächlich aus Kollagenfibrillen (Kollagen Typ I) bestehende organische Matrix ab und lagern darin als mineralische Komponente Calciumphosphat in der chemischen Form von Hydroxylapatit-Kristallen $[3 \text{ Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2]$ ein. Für den Abbau des Knochens (Knochenresorption) ist ein weiterer Zelltyp verantwortlich der als Osteoklast bezeichnet wird. Diese multinukleären Zellen entstehen aus der Fusion von mononukleären Vorläuferzellen des Knochenmarks. Aktive Osteoklasten liegen der mineralisierten Knochenmatrix eng an, wobei ein nach außen abgegrenzter Hohlraum zwischen Knochenoberfläche und Zellmembran entsteht. Der in diesem Raum durch aktiven Protonentransport gebildete saure pH-Wert von ca. 4,5 löst die Hydroxylapatit-Kristalle des Knochens auf. Der Abbau der organischen Bestandteile (z.B. Kollagenfibrillen) der Knochenmatrix erfolgt durch sezernierte proteolytische Enzyme z.B. Cathepsin K (Lippert, 2003; Lüllmann-Rauch, 2003).

Die Ausbildung des Säugetierskeletts beginnt bereits in der Embryonalentwicklung und lässt sich in zwei Entstehungswege unterteilen. (1.) Bei den als „Deckknochen“ bezeichneten Knochen differenzieren Mesenchymzellen direkt zu Osteoblasten (desmale Osteogenese). Auf diesem Wege werden beispielsweise Teile der Schlüsselbeine, die Knochen des Schädeldachs und die meisten Gesichtsknochen

gebildet. (2.) Im Unterschied dazu entstehen die so genannten „Ersatzknochen“ z.B. lange Röhrenknochen, Knochen der Schädelbasis und Wirbel durch den sukzessiven Ersatz einer Knorpelmatrix zu Knochen (enchondrale Osteogenese). Die aus dem Mesenchym differenzierten Knorpelzellen (Chondrozyten) produzieren eine aus Proteoglykanen und Kollagenfibrillen bestehende extrazelluläre Matrix, welche die hohe Festigkeit und Druckelastizität des Knorpels bewirkt.

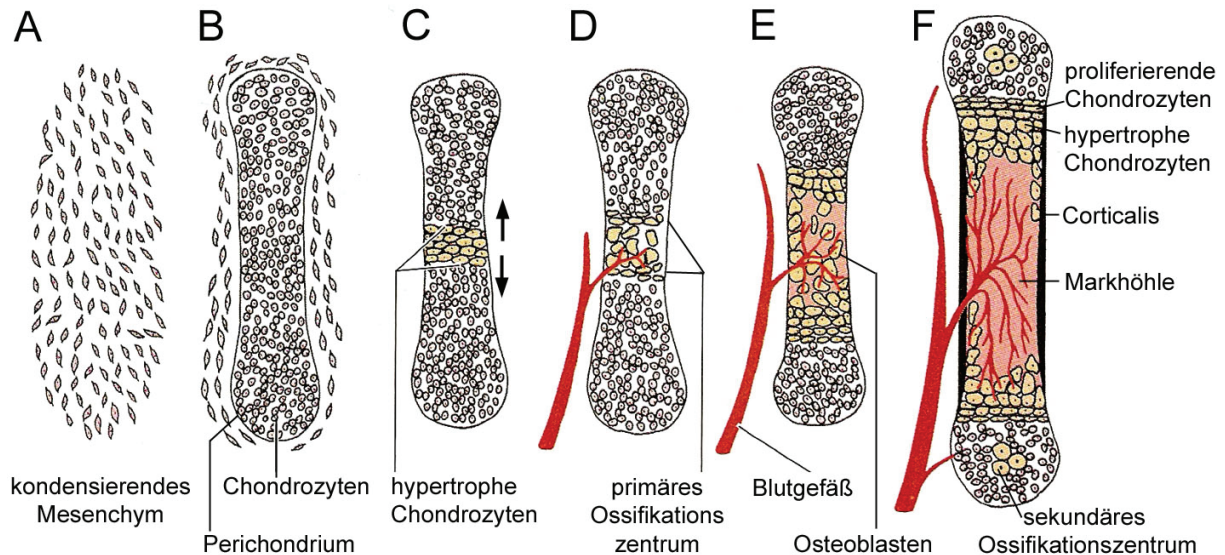


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der chondralen Osteogenese.

(A) Zu Beginn des Differenzierungsprozesses verdichtet sich das mesenchymale Gewebe (Kondensation) im Bereich des zukünftigen Skelettelements. (B) Die daraus hervorgehende, zunächst knorpelige Skelettanlage besteht aus proliferierenden Chondrozyten und wird von einem Perichondrium umhüllt. (C) Im zentralen Teil der Skelettanlage differenzieren die proliferierenden Chondrozyten zu hypertrophen Chondrozyten. Dieser Prozess schreitet in Richtung der Knochenenden fort (Pfeile). (D) Im primären Ossifikationszentrum sterben die terminal-hypertrophen Chondrozyten durch Apoptose ab und werden durch einwandernde Blutgefäße und Osteoprogenitorzellen ersetzt. (F) Der zentrale Teil des Skelettelements (Diaphyse) enthält die Markhöhle und wird von einer mineralisierten Knochenmanschette (Corticalis) umhüllt. In den Epiphysen entstehen sekundäre Ossifikationszentren. Der als Wachstumsfuge bezeichnete nicht-verknöcherte Bereich (bestehend aus proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten) ermöglicht das Längenwachstum des Knochens. [verändert nach Gilbert, 2000, Seite 456]

Im Verlauf der endochondralen Ossifikation durchlaufen die Knorpelzellen verschiedene Differenzierungsstadien, die als proliferierende, prähypertrophe, hypertrophe und terminal-hypertrophe Chondrozyten bezeichnet werden. Diese Reifestadien sind entlang der Wachstumsrichtung des Knorpels in aufeinander abfolgenden Zonen angeordnet, welche anhand ihrer Zellmorphologie sowie charakteristischer Bestandteile der extrazellulären Matrix voneinander abgrenzbar sind (Abb. 1.1C). Beispielsweise wird Kollagen Typ II von proliferierenden Chondrozyten und Kollagen Typ X von hypertrophen Chondrozyten in die

extrazelluläre Matrix abgegeben. Aufgrund der „blasenartig“ vergrößerten Zellen der hypertrophen Zone wird dieser Bereich auch als Blasenknorpel bezeichnet. Infolge von Proliferation (Zellteilung) und Hypertrophie (Volumenzunahme) der Chondrozyten kommt es zum Längenwachstum des Knorpels (interstitielles Wachstum). In ihrer letzten Differenzierungs-Stufe sterben die terminal-hypertrophen Chondrozyten durch Apoptose (programmierter Zelltod) ab. Der dabei entstehende Raum bietet Platz für einwandernde Blutgefäße und Osteoprogenitorzellen. Die zurückbleibende Knorpelmatrix wird teilweise durch Osteoklasten abgebaut, dient aber auch als Grundgerüst zur Anlagerung von Knochenmatrix durch Osteoblasten. Von diesem, im mittleren Bereich der Diaphyse gelegenen, primären Ossifikationszentrum schreitet die endochondrale Ossifikation in Richtung der Epiphysen voran (Abb. 1.2D). Im weiteren Verlauf kommt es innerhalb der Epiphysen zur Ausbildung von sekundären Ossifikationszentren (Abb. 1.2F).

Abgesehen vom Gelenkknorpel ist Knorpel immer von einem Perichondrium (Knorpelhaut) umgeben. Diese besteht aus einer äußeren Faserschicht, aus straffem Bindegewebe mit darin eingelagerten Fibroblasten, und einer inneren Schicht aus mesenchymalen Zellen (Abb. 1.2B). Letztere differenzieren zum einen zu Chondroblasten und ermöglichen somit das Dickenwachstum des Knorpels (appositionelles Wachstum) und zum anderen zu Osteoblasten, die eine den Knorpel umhüllende mineralisierte Knochenmanschette (Corticalis) aufbauen (Abb. 1.2F; perichondrale Ossifikation). Die Corticalis ist von einer Zellschicht umgeben, die analog zum Perichondrium als Periost bezeichnet wird.

Es ist zu betonen, dass ein Längenwachstum der Skelettelemente nur durch Proliferation und Hypertrophie der Chondrozyten in den Wachstumsfugen (Epiphysenfugen) ermöglicht wird. Im Verlauf der Osteogenese verengen sich diese immer weiter und verknöchern schließlich vollständig, wodurch das Längenwachstum der Knochen beendet wird (Gilbert, 2000; Lippert, 2003; Lüllmann-Rauch, 2003).

Am Beispiel des Radius (Speiche) lassen sich die ersten Schritte der endochondralen Ossifikation bei der Maus wie folgt zeitlich einordnen. Am 11. Tag der Embryonalentwicklung (E11) kondensiert das Mesenchym im Bereich der zukünftigen Knorpel-elemente und differenziert am nächsten Tag (E12) zu proliferierenden Chondrozyten. Am Tag E14 lassen sich die ersten hypertrophen Chondrozyten und am Tag E16 die ersten mineralisierten Bereiche nachweisen. Der Ablauf dieser Prozesse ist in unterschiedlichen Skelettelementen zeitversetzt, z.B.

beginnt die Differenzierung im Humerus früher und in Fingerknochen später als im Radius.

1.3. Die molekulare Steuerung der endochondralen Ossifikation

Die Differenzierung von mitotisch inaktiven Chondrozyten zu proliferierenden Chondrozyten und schließlich zu hypertrophen Chondrozyten wird durch eine Vielzahl von Signalwegen reguliert und koordiniert (Karsenty & Wagner, 2002; Kronenberg, 2003; Lefebvre & Smits, 2005; Goldring et al., 2006; Adams et al., 2007; Mackie et al., 2007; Day & Yang, 2008; Macsai et al., 2008).

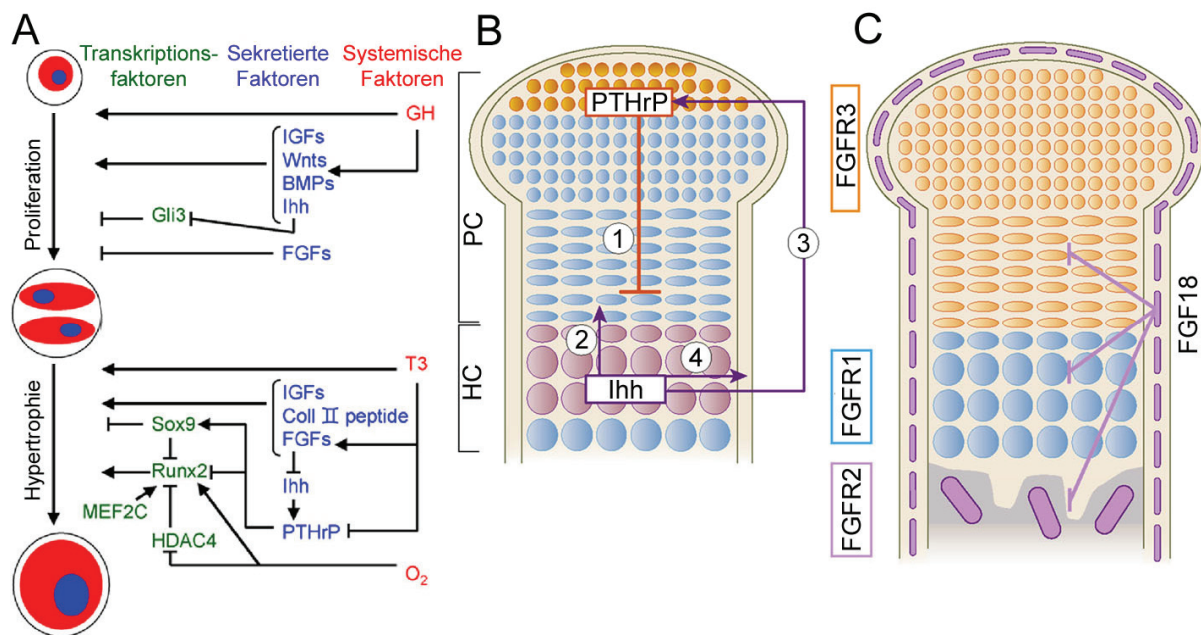


Abb. 1.3: Molekulare Regulation der Chondrozyten-Differenzierung.

(A) Beispiele für Regulatoren auf Ebene der Transkriptionsfaktoren (grüne Schrift), sekretierte Faktoren (blaue Schrift) und systemische Faktoren (rote Schrift). Pfeile kennzeichnen stimulierende und Querbalken inhibierende Effekte. Die Gennamen sind im Text unterhalb der Legende erklärt. (B) Ihh und PTHrP beeinflussen einander über eine negative Rückkopplungsschleife (siehe Text). (C) Vereinfachte Darstellung der Wachstumsfuge mit farblich abgegrenzter Gen-Expression der FGF-Rezeptoren: FGFR1 wird in hypertrophen Chondrozyten (blau), FGFR2 ist im Perichondrium und Osteoblasten (violett) und FGFR3 wird von proliferierenden Chondrozyten (gelb) exprimiert. Der sezernierte Ligand FGF18 wird im Perichondrium gebildet und aktiviert alle drei FGF-Rezeptoren. Abkürzungen: proliferierende Chondrozyten (PC), hypertrophe Chondrozyten (HC). [verändert nach (A) Mackie et al., 2007 und (B,C) Kronenberg, 2003]

Einige der wichtigsten Faktoren der Chondrozyten-Differenzierung und ihr Einfluss auf diese, sind in Abbildung 1.3A schematisch dargestellt. Es lassen sich drei Regulationsebenen unterscheiden: (1.) systemisch wirkende Faktoren z.B. Wachstumshormon (*growth hormone*, GH), Schilddrüsenhormon (Trijodthyronin, T3), Sauerstoffkonzentration (O₂); (2.) sekretierte, parakrin wirkende Faktoren z.B. *insulin-*

like growth factors (IGFs), *wingless-int growth factors* (Wnts), *bone morphogenic proteins* (BMPs), *Indian hedgehog* (Ihh), *fibroblast growth factors* (FGFs), *parathyroid hormon-related protein* (PTHrP) und (3.) Transkriptionsfaktoren z.B. *GLI-Kruppel family member GLI3* (Gli3), *SRY-(sex determining region Y)-box 9* (Sox9) und *run-related transcription factor 2* (Runx2) (Mackie et al., 2007). Die Aktivität der Transkriptionsfaktoren wird über verschiedene Signalkaskaden durch Faktoren der ersten und auch der zweiten Ebene reguliert (Pfeile in Abb. 1.3A).

Einige dieser Faktoren wurden durch die Analyse von erblich bedingten Skeletterkrankungen des Menschen identifiziert. Die Funktion des mutierten Genes wurde anschließend am Mausmodell näher untersucht (Zelzer & Olsen, 2003). Beispielsweise verursachen Mutationen im humanen Runx2 Gen im heterozygoten Zustand die Cleidocraniale Dysplasie (Mundlos, 1999). Dieser Phänotyp wird ebenfalls von heterozygoten Runx2^{+/-} Mausmutanten widergespiegelt. Durch die Analyse von homozygoten Runx2^{-/-} Tieren, bei denen nahezu das gesamte Skelett nicht verknöchert, konnte Runx2 als ein Hauptregulator der endochondralen Ossifikation identifiziert werden (Komori et al., 1997; Otto et al., 1997).

Die oben aufgelisteten Faktoren können bestimmten Signalwegen, welche die Knochenentwicklung regulieren, zugeordnet werden. Für die vorliegende Arbeit sind folgende, durch extrazelluläre Signalmoleküle regulierte Signalwege von Bedeutung: der negative Rückkopplungskreis von Ihh und PTHrP, der FGF-Signalweg und der Wnt-Signalweg. Diese werden im Folgenden kurz vorgestellt.

1.3.1. Der Ihh/PTHrP-Signalweg

Der Ihh/PTHrP-Signalweg kontrolliert sowohl Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten (Abb. 1.3B2) als auch die Differenzierung von Osteoblasten (Abb. 1.3B4). Das Ihh-Protein wird von prähypertrophen Chondrozyten synthetisiert und in die extrazelluläre Matrix sezerniert. Nach Bindung von Ihh an den membranständigen Rezeptor *Patched 1* (Ptch1), der von proliferierenden Chondrozyten exprimiert wird, kommt es zur Aktivierung des Membranproteins *Smoothed* (Smo) und einer Signalkaskade unter Beteiligung von Gli-Transkriptionsfaktoren (Vortkamp et al., 1996; Kronenberg, 2003). Aufschluss über die Funktion dieser Gene während der endochondralen Osteogenese lieferte die Analyse von verschiedenen Mausmodellen. Beispielsweise sind bei Ihh knock-out (Ihh^{-/-}) Mäusen die Skelettelemente verkürzt, da die Proliferationsrate der Chondrozyten im Vergleich zu normalen Mäusen (Wildtyp) vermindert ist (St-Jacques

et al., 1999). Komplementär hierzu ist bei *Ihh* überexprimierenden Mäusen die Proliferationsrate erhöht (Long et al., 2001). Zusätzlich zum direkten Effekt auf die Proliferation der Chondrozyten reguliert *Ihh* indirekt, vermittelt über PTHrP, die Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten. Eine erhöhte *Ihh*-Expression bewirkt eine verstärkte Synthese von PTHrP in den gelenksnahen Chondrozyten (Abb. 1.3B3). Das sezernierte PTHrP-Protein aktiviert den PTH-Rezeptor in den proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten und blockiert letztendlich deren weitere Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten (negative Rückkopplung; Abb. 1.3B1). Mit zunehmender Entfernung zum Syntheseort nimmt die Konzentration von PTHrP in der Wachstumsfuge ab (Morphogen-Gradient) und es kommt beim Unterschreiten eines Grenzwertes zur Differenzierung der prähypertrophen Chondrozyten und folglich zur Synthese von *Ihh*. Das Zusammenspiel von *Ihh* und PTHrP während der Chondrozyten-Differenzierung wird durch Ähnlichkeiten der Phänotypen, z.B. beschleunigte Hypertrophie, der *Ihh*^{-/-} sowie PTHrP^{-/-} oder PTH-Rezeptor^{-/-} Mausmutanten bestätigt (Karaplis et al., 1994; Lanske et al., 1996, St-Jacques et al., 1999). Bei PTHrP-überexprimierenden bzw. konstitutiv aktiven PTH-Rezeptor Mausmutanten ist hingegen eine verzögerte Chondrozyten-Differenzierung festzustellen (Weir et al., 1996; Schipani et al., 1997).

1.3.2. Der FGF-Signalweg

Ein weiterer gut untersuchter Regulator der Chondrozyten-Differenzierung ist der FGF-Signalweg (Ornitz & Marie, 2002). Insgesamt sind 22 FGF-Liganden und 4 FGF-Rezeptoren sowohl im Genom der Maus als auch in dem des Menschen beschrieben (Itoh, 2007). Abgesehen von intrazellulären FGFs (FGF11 bis 14) und den hormonähnlichen FGF15, FGF21 und FGF23 erfolgt die extrazelluläre Signalweiterleitung der klassischen FGFs über vier Transmembran-Rezeptor Tyrosinkinasen (FGFR1-4) (Itoh & Ornitz, 2008). An der Ausbildung des FGF-FGFR-Komplexes sind auch Heparansulfate beteiligt (siehe Abschnitt 1.6.). Die Ausbildung eines ternären Komplexes führt zur FGFR-Dimerisierung, Rezeptor-Phosphorylierung und der Aktivierung von Signalkaskaden. In den verschiedenen Stadien der Chondrozyten-Differenzierung sind mehrere unterschiedliche FGF-Liganden und FGF-Rezeptoren exprimiert. An dieser Stelle soll exemplarisch der gut untersuchte Einfluss von FGF18 und FGFR3 auf die endochondrale Ossifikation näher beschrieben werden. Die Aktivierung des, von proliferierenden Chondrozyten exprimierten, FGFR3 wirkt inhibierend auf die Proliferation dieser Zellen (Abb. 1.3C).

Deutlich wird dies bei $FGFR3^{-/-}$ Mäusen, die infolge der erhöhten Proliferationsrate eine vergrößerte Zone der proliferierenden Chondrozyten im Vergleich zu Wildtyp-Kontrolltieren aufweisen (Colvin et al., 1996; Deng et al., 1996). Im Mausmodell der humanen Achondroplasie, welches auf einer konstitutiv-aktivierenden $FGFR3^{ach}$ Mutation beruht, ist diese Zone verkürzt und die Proliferationsrate verringert (Naski et al., 1998). Neben einem direkten Einfluss von $FGFR3$ auf die Chondrozyten-Proliferation kann die veränderte Zonenlänge bei diesen Mausmutanten auch durch die veränderte *Ihh*-Expressionsstärke zustande kommen (Minina et al., 2002). So ist die Menge an *Ihh*-Transkripten bei $FGFR3^{-/-}$ Tieren erhöht und bei den $FGFR3^{ach}$ Mutanten verringert (Ornitz et al., 2002; Naski et al., 1998). Aufgrund von Ähnlichkeiten im Skelettphänotyp von $FGF18^{-/-}$ und $FGFR3^{-/-}$ Mäusen ist davon auszugehen, dass der im Perichondrium exprimierte $FGF18$ ein wichtiger endogener Ligand des $FGFR3$ ist (Abb. 1.3C; Liu et al., 2002; Ohbayashi et al., 2002). Im Unterschied zu $FGFR3^{-/-}$ Mäusen kommt es bei $FGF18^{-/-}$ Tieren zusätzlich zur verzögerten Mineralisierung des Knochens. Es ist daher anzunehmen, dass dieser Aspekt des Phänotyps durch andere $FGFR$ -Rezeptoren vermittelt wird, möglicherweise durch den in hypertrophen Chondrozyten exprimierten $FGFR1$ oder durch die im Perichondrium exprimierten $FGFR1$ bzw. $FGFR2$ (Abb. 1.3C; Kronenberg 2003).

1.3.3. Der Wnt-Signalweg

Wnt-Proteine sind sezernierte Glycoproteine, die vermittelt über die Transmembran-Rezeptoren der Frizzled-Genfamilie verschiedene Signaltransduktionswege aktivieren können. Gut untersucht ist der kanonische Signalweg (*canonical pathway*), welcher auch als Wnt/ β -Catenin-Signalweg bezeichnet wird. Bei diesem nimmt die Regulation des β -Catenin-Abbaus eine Schlüsselrolle ein. Im Grundzustand (d.h. ohne Wnt-Ligand) wird β -Catenin zunächst im so genannten „Abbaukomplex“ durch die *Glycogen Synthase Kinase 3 β* (GSK-3 β) phosphoryliert und schlussendlich im Proteasom abgebaut. Im Unterschied dazu verhindert die Bindung von Wnt-Liganden an die Frizzled-Rezeptoren und LRP5/6 Co-Rezeptoren, die Bildung des Abbaukomplexes und somit die Phosphorylierung von β -Catenin. Infolgedessen reichert sich β -Catenin im Cytoplasma an und aktiviert nach Translokation in den Zellkern, vermittelt über die Bindung an Lef/Tcf-Faktoren, die Transkription von Zielgenen (Day & Yang, 2008).

Im Genom der Maus sind 10 Frizzled- und 19 Wnt-Gene annotiert. Zahlreiche Wnts sind in den unterschiedlichen Zellpopulationen des Knorpel- und Knochengewebes exprimiert (Andrade et al., 2007; Day & Yang, 2008; Macsai et al., 2008). Als Beispiele für die vielfältigen Funktionen werden im Folgenden drei Wnts exemplarisch herausgegriffen. Wnt5a wird von proliferierenden Chondrozyten sezerniert und wirkt inhibierend auf die Proliferation und begünstigt die Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten. Im Unterschied dazu wirkt Wnt5b, welches von hypertrophen Chondrozyten gebildet wird, stimulierend auf die Proliferation und inhibierend auf die Differenzierung der proliferierenden Chondrozyten (Yang et al., 2003). Wnt10b verstärkt die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten und begünstigt somit den Knochenaufbau (Bennett et al., 2005).

1.4. Heparansulfat-Proteoglykane

Die Signalweiterleitung vieler sezernierter Faktoren, einschließlich der oben beschriebenen FGFs, Ihh und Wnts, wird durch Heparansulfate (HS) moduliert (Perrimon & Bernfield, 2000). HS sind lineare Polysaccharide (Glucosaminoglykane), die in der extrazellulären Matrix fast jeder Zelle vorhanden sind. Sie bestehen aus 50 bis 200 Disaccharid-Untereinheiten, die aus N-Acetylglukosamin- (GlcNAc) und Glucuronsäure-Derivaten (GlcUA) zusammengesetzt sind. Die HS-Biosynthese erfolgt im Golgi-Apparat und beginnt mit dem Transfer von Xylose an bestimmte Serinreste der Trägerproteine z.B. Agrin, Glypican, Perlecan oder Syndecan (Abb. 1.4A). Durch verschiedene Glycosyltransferasen wird schließlich ein „Tetrasaccharid-Linker“ bestehend aus Glucuronsäure-Galaktose-Galaktose-Xylose gebildet. Dieser dient als Ausgangspunkt für die HS-Kettenverlängerung mit UDP-aktivierten GlcUA- bzw. GlcNAc-Monosacchariden durch die Glycosyltransferasen *Exostosin 1* (Ext1) und Ext2 (Abb. 1.4B). Anschließend wird das Zuckergrundgerüst durch verschiedene Enzyme teilweise modifiziert. Zunächst ersetzen N-Deacetylasen/Sulfotransferasen (NDST) in bestimmten Abschnitten der HS-Kette (S-Domäne) die N-Acetylgruppen der GlcNAc-Reste durch Sulfatgruppen ($-\text{SO}_3^-$). In den S-Domänen folgen nun weitere Veränderungen, Glucuronsäurereste (GlcUA) werden durch die C5-Epimerase (Hsepi) in Iduronsäurereste (IduUA) umgewandelt. Durch 2-O-Sulfotransferasen (Hs2st), 3-O-Sulfotransferasen (Hs3st) und 6-O-Sulfotransferasen (Hs6st) werden weitere Sulfatgruppen an die entsprechenden 2-O-, 3-O- oder 6-O-Positionen der Zucker angefügt (Abb. 1.4B; Gorski & Stringer, 2007; Lamanna et al., 2007).

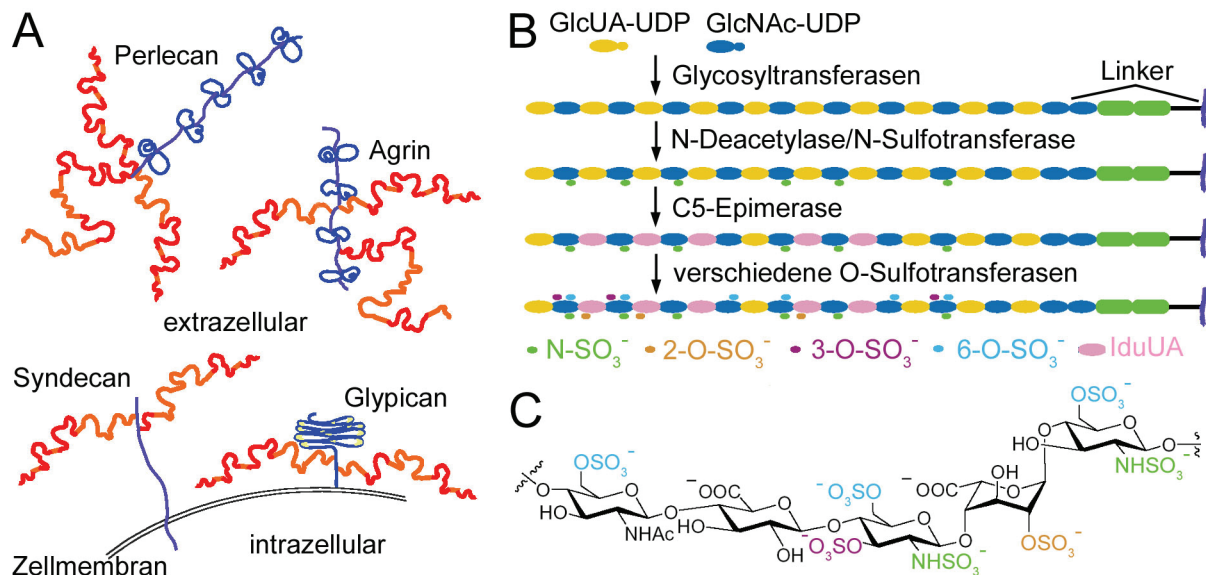


Abb. 1.4: Heparansulfat-Proteoglykane und HS-Biosynthese.

(A) Beispiele für HS-Proteoglykane. Die Trägerproteine (blau dargestellt) können transmembran (z.B. Syndecan) oder durch einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker an der Zellmembran (z.B. Glypican) oder in der extrazellulären Matrix (z.B. Perlecan oder Agrin) lokalisiert sein. Die HS-Ketten (in orange und rot dargestellt) sind kovalent mit dem Trägerprotein verbunden. Bereiche die stark sulfatiert sind (rot, S-Domäne) wechseln mit kaum sulfatierten Bereichen (orange, NAc-Domäne) entlang der HS-Kette ab. **(B)** Schematische Darstellung HS-Biosynthese im Golgi-Apparat. **(C)** Strukturformel eines HS-Teilabschnittes mit farblich hervorgehobenen N-, 2-O-, 3-O- und 6-O-Sulfatgruppen. [verändert nach (A) Perrimon & Bernfield 2000, Seite 726 und (B,C) Chapman et al., 2004, Seite 3537]

Durch die unterschiedliche Expression der zahlreichen Sulfotransferase-Isoformen entstehen in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien HS mit unterschiedlicher Abfolge von sulfatierten und unsulfatierten 2-O-, 3-O-, 6-O- und N-Positionen (Abb. 1.4C; Perrimon & Bernfield, 2000; Ledin et al., 2004). Dieses Sulfatierungsmuster beeinflusst die Wechselwirkung von HS und extrazellulären Wachstumsfaktoren (Farach-Carson et al., 2005; Lamanna et al., 2007). Sehr gut untersucht ist die Bedeutung des Sulfatierungsmusters auf die HS-Bindungspräferenzen von verschiedenen FGFs (Mohammadi et al., 2005; Noti et al., 2006). Beispielsweise sind für die FGF2-HS-Bindung 2-O-Sulfatgruppen notwendig, während die 6-O-Sulfatgruppen von untergeordneter Bedeutung sind. Hingegen wird die HS-Bindung von FGF18 sowohl von 2-O- als auch von 6-O-Sulfatgruppen beeinflusst (Ashikari-Hada et al., 2004).

Die Bedeutung von HS für die Knorpel- und Knochenentwicklung wird deutlich durch Skelettveränderungen, die durch Gendefekte von HS-synthetisierenden (z.B. Ext1, Ext2) oder modifizierenden Enzymen (z.B. Hs2st) oder von HS-Trägerproteinen (z.B. Aggrecan, Glypican 3 oder Perlecan) hervorgerufen werden (Bullock et al., 1998;

Arikawa-Hirasawa et al., 2001; Schwartz & Domowicz et al., 2002; Koziel et al., 2004; Farach-Carson et al., 2005).

1.5. Die Sulfatase-Genfamilie der Säugetiere

Sulfatasen sind Enzyme (EC 3.1.6.), welche die Hydrolyse von Sulfatestern (CO-S) bzw. Sulfamiden (CN-S) katalysieren. Von den einzelnen Sulfatasen werden sehr verschiedene sulfatgruppenhaltige Substrate, wie z.B. Spingolipide, Steroide oder langkettige Polysaccharide, wie z.B. Heparansulfat und Chondroitinsulfat umgesetzt (Tab.1.1; Hanson et al., 2004). Die einzelnen HS-Sulfatasen unterscheiden sich weiterhin in ihrer Spezifität für unterschiedliche Positionen der Sulfatgruppen (Abb. 1.4C). Beispielsweise entfernt die Iduronat-2-Sulfatase (Ids) die 2-O-Sulfatgruppen und die Glucosamin-(N-Acetyl)-6-Sulfat-Sulfatase (Gns) die 6-O-Sulfatgruppen. Weiterhin bestehen Unterschiede, ob der Abbau der 6-O-Sulfatgruppen vom Äußeren, nicht-reduziertem Ende der HS-Polysaccharidkette durch eine 6-O-Exosulfatase (Gns) oder innerhalb der HS-Kette durch eine 6-O-Endosulfatase (Sulf1 oder Sulf2) erfolgt.

Anhand von konservierten Aminosäurebereichen im N-Terminus ist es möglich Sulfatasen, anhand ihrer Sequenz *in silico* zu identifizieren. So sind im vollständig sequenzierten Genom des Menschen 17 und in dem der Maus 14 Sulfatasen annotiert (Sardiello et al., 2005). Von diesen sind neun Sulfatasen biochemisch gut charakterisiert (Tab.1.1; Hanson et al., 2004). Für die kürzlich *in silico* entdeckten acht Arylsulfatasen D bis K (ArsD bis ArsK) liegen noch keine Informationen über ihr natürliches Substrat vor. Möglicherweise ist eine von ihnen für die bisher nur von gereinigten Proteinextrakten bekannte HS-Glucosamin-3-Sulfat bzw. HS-Glucuronsäure-2-Sulfat abspaltende Aktivität verantwortlich (Hanson et al., 2004).

Eine Gemeinsamkeit von allen eukaryontischen Sulfatasen ist ein Cysteinrest in einem hoch konservierten Abschnitt (CXPSRXXX[L/M]TG[R/K/L]) im N-Terminus des Proteins. Dieser wird posttranslational zu C_α-Formylglycin umgewandelt (Dierks et al., 2003). Diese Reaktion wird durch den *Sulfatase Modifying Factor 1* (Sumf1) katalysiert und ist für die enzymatische Aktivität der eukaryontischen Sulfatasen unabdingbar. Mutationen im Sumf1 Gen führen zum seltenen Krankheitsbild des *Multiplen Sulfatase-Mangels* (Cosma et al., 2003; Dierks et al., 2003). Das Sumf1^{-/-} Mausmodell spiegelt daher einen kombinierten *loss of function*-Phänotyp von allen Sulfatasen wieder. So weisen Sumf1^{-/-} Tiere eine erhöhte Mortalitätsrate von 90%, eine geringe Körpergröße, Skelettveränderungen und neuronale Defekte auf (Settembre et al., 2007, 2008a).

Tabelle 1.1: Übersicht der 17 Sulfatasen des Menschen.

Name (Synonym)	Gen-symbol	Lokali-sation	Natürliches Substrat	Krankheit beim Menschen
Arylsulfatase A	ArsA	LYS	Spingolipide z.B. Cerebroside-3-sulfat	Metachromatische Leukodystrophie
Arylsulfatase B (Chondroitin-4-sulfat Sulfatase)	ArsB	LYS	Chondroitinsulfat und Dermatansulfat (4-O-Sulfatgruppe Gal)	Mukopolysaccharidose Typ VI (Maroteaux-Lamy Syndrom)
Arylsulfatase C (Steroid-Sulfatase)	ArsC (Sts)	MIC	Steroidsulfat	X-chromosomale Ichthyose
Arylsulfatase D	ArsD	ER	unbekannt	
Arylsulfatase E	ArsE	GA	unbekannt	Chondrodysplasia punctata 1
Arylsulfatase F	ArsF	ER	unbekannt	
Arylsulfatase G	ArsG	ER	unbekannt	
Arylsulfatase H	ArsH	UN	unbekannt	
Arylsulfatase I	ArsI	ER	unbekannt	
Arylsulfatase J	ArsJ	ER	unbekannt	
Arylsulfatase K	ArsK	UN	unbekannt	
Galaktosamin-(N-Acetyl)-6-Sulfat-Sulfatase	Galns	LYS	Chondroitinsulfat und Keratansulfat; (6-O-Sulfatgruppe Gal)	Mukopolysaccharidose Typ IV A (Morquio A Syndrom)
Glucosamin-(N-Acetyl)-6-Sulfat-Sulfatase	Gns	LYS	Heparansulfat und Keratansulfat; (6-O-Sulfatgruppe Glc)	Mukopolysaccharidose Typ III D (Sanfilippo D Syndrom)
Iduronat-2-Sulfatase	Ids	LYS	Heparansulfat und Dermatansulfat; (2-O-Sulfatgruppe Idu)	Mukopolysaccharidose Typ II (Hunter Syndrom)
N-Sulfoglucosamin-Sulfohydrolase (Sulfamidase)	Sgsh	LYS	Heparansulfat; (N-Sulfatgruppe Glc)	Mukopolysaccharidose Typ III A (Sanfilippo A Syndrom)
Sulfatase 1	Sulf1	ZOB	Heparansulfat; (6-O-Sulfatgruppe Glc)	
Sulfatase 2	Sulf2	ZOB	Heparansulfat; (6-O-Sulfatgruppe Glc)	

Die subzelluläre Lokalisation der Sulfatasen ist abgekürzt als: Endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgi Apparat (GA), Lysosom (LYS), Microsom (MIC), unbekannt (UN), Zelloberfläche (ZOB). Wenn bekannt, ist das natürliche Substrat und die Position der abgespalteten Sulfatgruppen von Galaktose- (Gal), Glucose- (Glc) oder Iduronsäure- (Idu) Derivaten angegeben, sowie das Krankheitsbild, welches von der mutierten Sulfatase hervorgerufen wird. Im Genom der Maus sind nur 14 Sulfatasen enthalten, es fehlen ArsD, ArsF und ArsH. Die ArsE Sequenz der Maus ist nur in Teilbereichen bekannt. [zusammengestellt nach Hanson et al., 2004; Diez-Roux & Ballabio, 2005; Sardiello et al., 2005.]

Betrachtet man die Auswirkung von Gendefekten einzelner Sulfatasen, so zeigt sich, dass diese für mindestens acht monogenetisch bedingte Erbkrankheiten verantwortlich sind (Tab.1.1). Zu diesen Krankheiten gehören die *Metachromatische Leukodystrophie* und fünf Typen von Mukopolysaccharidosen, welche durch Mutationen einzelner lysosomalen Sulfatasen hervorgerufen werden (Tab.1.1). Bei

diesen Stoffwechselkrankheiten führt der gestörte Abbau von Glucosaminoglykanen wie z.B. Chondroitinsulfat oder HS zur Anreicherung von Makromolekülen in sogenannten Residualkörperchen und schließlich zu Zell- bzw. Organschädigungen. Gendefekte in den nicht-lysosomalen Sulfatasen *ArsC* bzw. *ArsE* führen zur *X-chromosomalen Ichtyose* bzw. zur *X-chromosomalen Chondrodysplasia punctata 1* (Hanson et al., 2004; Diez-Roux & Ballabio, 2005).

1.6. Heparansulfat-6-O-Endosulfatasen

Das HS-Sulfatierungsmuster wird nicht allein während der HS-Biosynthese im Golgi Apparat generiert, sondern kann selbst nach dem Ausschleusen der Proteoglykane aus der Zelle noch verändert werden. Verantwortlich hierfür sind die beiden homologen Sulfatasen, Sulf1 und Sulf2. Diese, an die Zelloberfläche sezernierten, Enzyme spalten 6-O-Sulfatgruppen (Desulfurierung) durch Hydrolyse innerhalb der HS-Ketten in den S-Domänen ab (Abb. 1.5A; Ai et al., 2006; Lamanna et al., 2006). Im Unterschied zu anderen Sulfatasen enthält die Proteinsequenz von Sulf1 und Sulf2 eine circa 300 Aminosäurereste umfassende hydrophile Domäne, die für die Bindung an die Zelloberfläche und die enzymatische Aktivität von Bedeutung ist (Morimoto-Tomita et al., 2002; Ai et al., 2006).

In unterschiedlichen Modellsystemen konnten Veränderungen von verschiedenen Signalwegen, wie beispielsweise der BMP-, FGF-, Shh- und Wnt-Signalwege, nach Überexpression von Sulf1 (teilweise auch von Sulf2) nachgewiesen werden (Lamanna et al., 2007). Gut untersucht ist die zur Sulfatase 1 (Sulf1) der Säugetiere orthologe Sulfatase 1 der Wachtel (QSulf1, *Coturnix coturnix*, engl. quail). Beispielsweise bewirkt die Überexpression von QSulf1 in CHO-Zellen die Freisetzung des BMP-Inhibitors Noggin von der Zelloberfläche, wodurch die Ansprechbarkeit auf BMP-Signale in diesen Zellen wieder hergestellt wird (Viviano et al., 2004). Des Weiteren wurde eine aktivierende Wirkung von QSulf1, Sulf1 und Sulf2 auf den Wnt-Signalweg in Säugerzellkulturen und bei Krallenfrosch-Embryonen nachgewiesen (Abb. 1.5B; Dhoot et al., 2001; Ai et al., 2003; Nawroth et al., 2007; Freeman et al., 2008). Für den Sonic hedgehog- (Shh-) Signalweg wurde ebenfalls eine aktivierende Wirkung von QSulf1, genauer eine größere Reichweite des Shh-Signals, nach Überexpression im Rückenmark von Hühnerembryonen nachgewiesen (Danesin et al., 2006). Im Gegensatz dazu bewirkt die Überexpression von QSulf1 in Krallenfrosch- (*Xenopus*-) und Hühner-Embryonen eine Inhibition des FGF-Signalwegs. Vermutlich wird durch die HS 6-O-Desulfurierung die Ausbildung des ternären FGF2-HS-FGFR1 Komplexes verhindert (Abb. 1.5C; Wang et al., 2004).

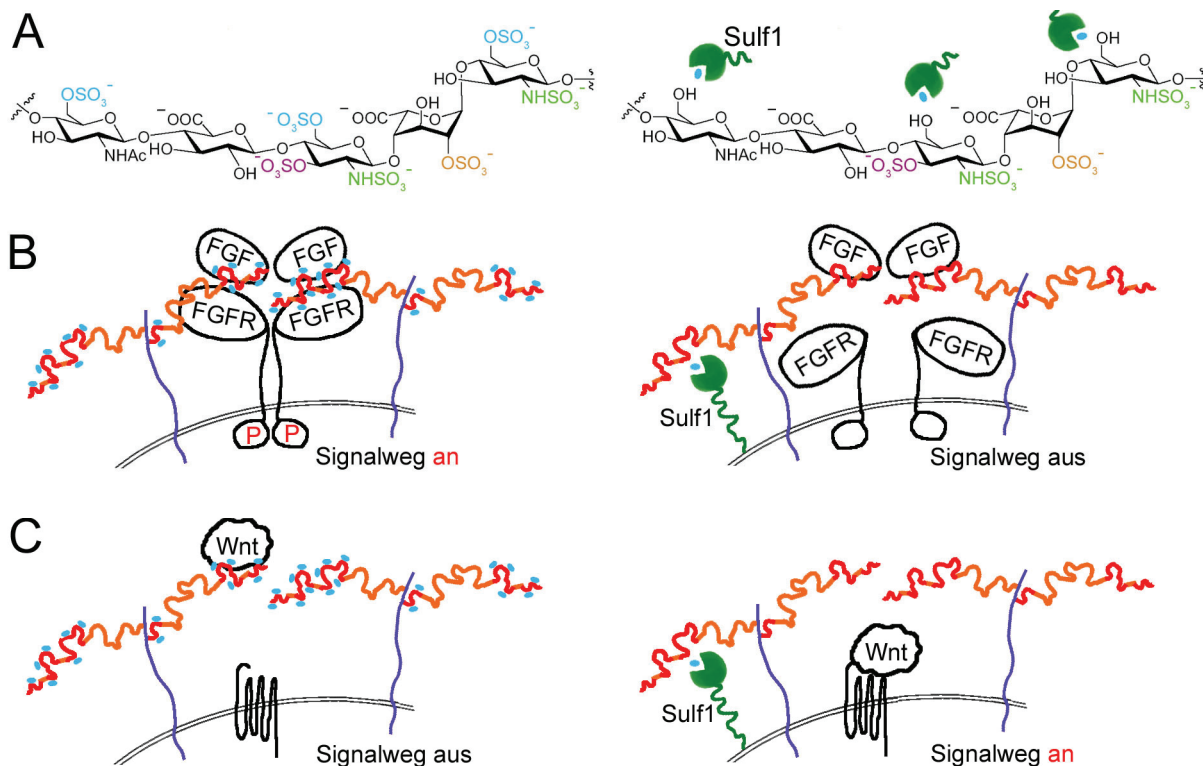


Abb. 1.5: Beispiele für Signalweg-Aktivierung bzw. -Inhibierung durch Sulf1.

(A) Ausschnitt einer HS-Kette mit farblich abgesetzten Sulfatgruppen (linke Seite) und nach erfolgter Abspaltung der 6-O-Sulfatgruppen (blaue Punkte) durch die 6-O-Endosulfatase Sulf1 (grün dargestellt; rechte Seite). (B) Sulf1 wirkt inhibitorisch auf den FGF-Signalweg. FGF-Ligand, HS (rot-orange dargestellt) und FGFR bilden einen ternären Komplex, der die Rezeptor-Dimerisierung ermöglicht und nach Phosphorylierung der intrazellulären Domäne zur Aktivierung des Signalweges führt (linkes Schema). Nach Abspaltung der 6-O-Sulfatgruppen durch Sulf1 ist die Bindung von FGFR1 und HS vermindert und folglich unterbleibt die Rezeptor-Dimerisierung. Die Bindung des FGF2-Liganden und HS ist unverändert, da die 2-O-Sulfatgruppen erhalten bleiben (rechtes Schema). (C) Sulf1 wirkt aktivierend auf den Wnt-Signalweg. Der Wnt-Ligand bindet an HS und wird dadurch von der Zellmembran und dem Frizzled-Rezeptor ferngehalten (linkes Schema). Durch Abspaltung der 6-O-Sulfatgruppen durch Sulf1 wird der Wnt-Ligand freigesetzt und kann an den Rezeptor binden und den Signalweg aktivieren (rechtes Schema). [verändert nach (A) Wang et al., 2004, Seite 4837 und (B) Ai et al., 2003, Seite 348]

Während der Embryonalentwicklung sind *Sulf1* und *Sulf2* in verschiedenen Geweben, z.B. Endhirnbläschen, Somiten und interessanterweise auch in der Gelenkregion der Gliedmaßen co-exprimiert. Außerdem wird *Sulf2* in proliferierenden Chondrozyten exprimiert (Ohto et al., 2002; Nagamine et al., 2005; Zhao et al., 2006; Holst et al., 2007; Lum et al., 2007). Es lässt sich daher vermuten, dass diese 6-O-Endosulfatasen, durch die Beeinflussung der Bindungseigenschaften von HS und Wachstumsfaktoren, Signalwege und Musterbildungsprozesse in der Embryonalentwicklung, evtl. auch während der Knorpel- und Knochenentwicklung modulieren könnten.

1.7. Zielsetzung der Arbeit

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte in der Entschlüsselung von Genomen und Transkriptomen verschiedener Modellorganismen erzielt. Im Zuge dessen konnten zahlreiche Gene *in silico* identifiziert werden. So umfasst die Genfamilie der Sulfatasen mittlerweile beim Mensch 17 und bei der Maus 14 Mitglieder. Jedoch reicht der Kenntnisstand bei einigen der kürzlich entdeckten Sulfatasen kaum über die Sequenzinformation hinaus.

Ein Ziel dieser Doktorarbeit ist die Charakterisierung der räumlichen und zeitlichen Gen-Expression der verschiedenen Sulfatasen der Maus (*Mus musculus*), während der Embryonalentwicklung im Knorpel- und Knochengewebe.

Für funktionelle *in vivo* Untersuchungen werden drei in Chondrozyten exprimierte Sulfatasen Arsl, Sulf1 und Sulf2 ausgewählt. Die bisher kaum untersuchte Arsl soll mittels RCAS-Virus in der Flügelanlage von Hühnerembryonen überexprimiert werden.

Der Schwerpunkt der Arbeit liegt allerdings auf der Untersuchung der 6-O-Heparansulfat-Endosulfatasen Sulf1 und Sulf2. Anhand von Deletions- bzw. Überexpressions-Mausmodellen soll deren Einfluss auf die endochondrale Ossifikation untersucht werden:

- Die Auswirkung der Deletion von Sulf1 und Sulf2 Genprodukten bei allen Zellen soll mittels sogenannter Genetrap Mausmutanten untersucht und phänotypisch mit knock-out Deletions-Mausmutanten verglichen werden.
- Die Auswirkung der spezifischen Überexpression von Sulf1- und Sulf2-Genprodukten in proliferierenden Chondrozyten unter Kontrolle des Kollagen Typ II (Col2a1) Promotors soll bei transgenen Mausmutanten untersucht werden.

Als Nebenprojekt soll die molekulare Ursache des Skelettphänotyps, einer im Verlauf dieser Arbeit generierten transgenen Mauslinie (Col2-Sulf1^{tg199}) untersucht werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden z.B. Agarose-Gelelektrophorese, DNA-Restriktionsverdau, Ligation von DNA-Fragmenten, Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA, sowie Transformation von *E. coli* Bakterien wurden nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook et al., 2001).

2.1.1. Isolierung von genomischer DNA zur Genotypisierung

Die Gewebeproben (Schwanzspitzen oder Amnionhüllen) wurden über Nacht bei 55°C in 500 µl Lysispuffer (17 mM EDTA; 170 mM NaCl; 0,85% SDS; 17 mM Tris/HCl, pH 7,5) und Proteinase K (200 µg/ml, Roche) verdaut. Nach Zugabe von 250 µl 5 M NaCl wurde für 10 min geschüttelt und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 7.000 rpm (Tischzentrifuge, Eppendorf) wurden 500 µl des Überstandes mit 1 ml 100% Ethanol versetzt und für 3 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet in 250 µl Wasser resuspendiert.

2.1.2. Isolierung von DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mittels Säulenchromatographie-Kits der Firmen A&A Biotechnology (Polen) oder Qiagen und wurde nach den jeweiligen Herstellerangaben durchgeführt. Zur Aufreinigung von elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkten oder DNA-Restriktionsfragmenten wurde der *Gel Extraction Kit Qiaquick* (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet.

2.1.3. Isolierung von Gesamt-RNA

Die Gewebeproben (Extremitäten von E14,5 Mausmutanten) wurden in 800 µl *peqGOLD TriFast* (PeqLab) im 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einem Plastikstößel zerrieben. Die weitere Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte nach Herstellerangaben (PeqLab) und beruht auf einer Phenol-Chloroform Extraktion mit nachfolgender Isopropanol Fällung der RNA. Das RNA-Pellet wurde in 100 µl DEPC-Wasser gelöst.

2.1.4. Reverse Transkription

Jeweils 1 µg Gesamt-RNA wurde mittels *TaqMan Reverse Transcription Reagents* und Random-Hexameren (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben (100 µl Ansatz).

2.1.5. Standard-PCR und DNA-Sequenzierung

DNA-Abschnitte können mittels Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR), bei der Gen-Sequenzspezifische Oligonukleotide (Vorwärts- und Rückwärtsprimer) und DNA-Polymerase verwendet werden, vervielfältigt werden (Saiki et al., 1988). Je nach PCR-Anwendung wurden verschiedene DNA-Polymerasen mit den mitgelieferten Puffern nach Herstellerangaben verwendet. Beispielsweise wurde für Genotypisierungs-PCR die *Taq*-DNA-Polymerase (Eppendorf) und für die Klonierungs-PCR, bei der eine sehr geringe Fehlerrate benötigt wurde, die *Phusion*-DNA-Polymerase (Finnzymes, Finnland) oder *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega) verwendet. Die PCR wurde mit dem *GeneAmp PCR System 9600* (Applied Biosystems) durchgeführt. Die speziellen PCR-Bedingungen der Genotypisierungs-PCR sind in Abschnitt 2.6. angegeben.

Die DNA-Sequenzreaktion wurde mit der BigDye v3.1 (Applied Biosystems) Reagenz nach Herstellerangaben angesetzt und am Institut für Medizinische Genetik der Charité (Berlin) auf Kapillarsequenzierern analysiert. Die Auswertung der Sequenz-Chromatogramme (*.abi Tracefiles) erfolgte mit dem Programm SeqManII (Lasergene Programmpaket).

2.1.6. Quantitative RT-PCR

Zur quantitativen Bestimmung der DNA-Menge wurde das Realtime-PCR-Gerät ABIPrism 7900 HT (Applied Biosystems) im 384-well Plattenformat eingesetzt. Der bei der quantitativen RT-PCR verwendete Farbstoff *SYBR Green* besitzt die Eigenschaft nach Bindung an doppelsträngiger DNA zu fluoreszieren. Er ermöglicht daher durch Messung der Fluoreszenz-Zunahme im Verlauf der PCR die Berechnung der Ausgangs DNA-Menge in der Probe. In dieser Arbeit wurde eine relative Quantifizierung durchgeführt, d.h. die DNA-Menge von Mutanten- und Wildtyp-Tieren wurde relativ zueinander und nicht absolut bestimmt. Um Unterschiede in der DNA-Menge zwischen den einzelnen Tieren auszugleichen wurde die *Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase* (Gapdh) als Referenz-Gen verwendet. Die Daten wurden mit der Standardkurven-Methode (Applied Biosystems, 2001) mit fünf 1:2 Verdünnungsstufen und der SDS 2.1 Software (Applied Biosystems) ausgewertet. Der 18 µl Reaktionsansatz bestand aus 9 µl *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems); je 4,5 pmol Vorwärts- und Rückwärts-Primer; 5,4 µl Wasser und 0,6 µl cDNA (entspricht 6 ng Gesamt-RNA). Das Thermalcycling-Programm bestand aus 40 Zyklen mit 15 Sekunden bei 95°C und 1 min bei 60°C.

Anschließend wurde eine Schmelzkurve erstellt, mit der die spezifische Amplifikation des gewünschten PCR-Produktes überprüft wurde. Die verwendeten Primer wurden mit dem Primer3 Programm (Rozen & Skaletsky, 2000) ausgewählt (Tab. 2.5). Die Gapdh-Primer wurden aus Hecht et al. (2007) übernommen.

Für die Amplifikation aus cDNA-Templates (RT-PCR und qRT-PCR) wurden möglichst Vorwärts- (*forward*, F) und Rückwärts- (*reverse*, R) Primer verwendet die in verschiedenen Exons binden, um die PCR-Amplifikation von eventueller genomischer DNA (gDNA) Kontamination zu vermeiden. Primer für die Amplifikation von gDNA (qPCR) wurden in DNA-Abschnitte ohne repetetive Elemente gelegt, welche mit der Software RepeatMasker (Smit & Green, nicht publiziert) identifiziert wurden. Alle Primerpaare wurden mittels BLAST-Analyse (Altschul et al., 1990) gegen die NCBI-GenBank Sequenzen auf ihre Spezifität überprüft.

2.1.7. Klonierung von Arsl, Sulf1 und Sulf2 Expressionskonstrukten

Als Ausgangsmaterial wurden *IMAGE clone* (IC) Plasmide (*Ressourcen Zentrum Primäre Datenbanken*, RZPD, Berlin) mit Ganzlängen *Mus musculus* cDNA Sequenzen für Arsl, Sulf1 und Sulf2 verwendet (Abschnitt 2.9.3.; DNA-Sequenzen siehe Anhang 8.2.1-8.2.3). Der Proteinkodierende DNA-Abschnitt (*coding sequence*, CDS) wurde mittels PCR amplifiziert. Die dazu verwendeten Primer (Tab. 2.6) sind am 5'-Ende verlängert, sodass mit dem Vorwärtsprimer eine *blunt end*-Schnittstelle (*EcoRV* bzw. *NruI*) gefolgt von einer Kozak-Sequenz (GCCACC) angefügt wurde. Es wurden jeweils zwei unterschiedliche Rückwärtsprimer verwendet. (1.) Für die Klonierung der unmodifizierten CDS enthielt der Rückwärtsprimer das endogene Stopcodon und daran angefügt eine *EcoRV* (Sulf1) bzw. *NruI* (Arsl, Sulf2) Schnittstelle. (2.) Für die Klonierung der C-terminal markierten CDS, wurde das Stopcodon durch eine *SacII* Schnittstelle ersetzt (Tab. 2.6).

2.1.7.1. pcDNA3.1/V5-His Expressionskonstrukte

Die Sulfatase CDS ohne Stopcodon (Abschnitt 2.1.7) wurde mittels *EcoRV* & *SacII* (Sulf1) bzw. *NruI* & *SacII* (Arsl, Sulf2) Doppelverdau vom pCR4-TOPO Vektor getrennt, Gel-gereinigt und in den *EcoRV* und *SacII* geschnittenen pcDNA3.1/V5-His-B Vektor (Invitrogen) kloniert. Dieser Säugerzellen-Expressionsvektor fügt am C-Terminus der Sulfatase-CDS ein V5-Epitop (GKPIPNNLLGLDST) und ein 6xHis-Epitop (HHHHHH) an, welche mit spezifischen Antikörpern detektiert werden können.

2.1.7.2. Arsl-RCAS Konstrukt

Ausgehend von der *Mus musculus* Arsl Sequenz im Expressionsplasmid (pcDNA3.1/V5-His-B; Abschnitt 2.1.7.1.) wurde die Proteincodierende Arsl Sequenz inklusive Kozaksequenz und des C-terminalen V5-Epitops, aber ohne 6x His Epitop, mittels PCR und den Primern MmArsl-Nrul-F und V5-Stop-R amplifiziert (Tab. 2.6). Das PCR-Produkt wurde Gel-gereinigt und in den RCAS-BPA (Replication-competent ASLV long terminal repeat with a splice acceptor) Vektor ligiert (RCAS-Arsl-V5 clone 11, Anhang 8.3.). Der hierbei verwendete RCAS-BPA (Swal) Vektor wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Jochen Hecht (MPI für molekulare Genetik, Berlin) zur Verfügung gestellt und kann direkt zur Ligation von PCR-Produkten verwendet werden (Anhang 8.3.).

2.1.8. Sulf1 und Sulf2 Peptid-Antikörper

In Zusammenarbeit mit Eurogentec wurden im Kaninchen Peptid-Antikörper gegen die synthetisierten Peptide Sulf1 (H₂N-ARNLYSRGLHDKDKEC-CONH₂) und Sulf2 (H₂N-KYKTSYARNRSIRSC-CONH₂) produziert. Diese Epitope liegen im Bereich der hydrophilen Domäne von Sulf1 bzw. Sulf2 und besitzen keine Homologie zu anderen Sulfatasen. Das Serum vom *final bleeding* wurden von Eurogentec mit dem zur Immunisierung verwendeten Peptid affinitätsgereinigt und wird in dieser Arbeit als Anti-Sulf1-103 und Anti-Sulf2-106 bezeichnet.

2.1.9. SDS-PAGE und Western blot

Proteinlysate von Zellkultur oder Mäuseembryonen wurden in RIPA-Puffer (150 mM NaCl; 10 mM Tris, pH 7,2; 0,1% SDS; 1% Triton-X-100; 1% Sodiumdeoxycholat; 1 mM EDTA) versetzt mit *Complete Proteinase Inhibitor Cocktail* (Roche) (1 Tablette auf 50 ml RIPA-Puffer) im 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einem Plastikstößel zerrieben und anschließend zehnmal durch eine Kanüle gezogen. Nach 5 min Zentrifugation bei 13.000 rpm bei 4°C wurde die Proteinkonzentration des Überstands mit dem *BCA-Protein Assay Kit* (Pierce, USA) bei 562 nm im *BioPhotometer 6131* (Eppendorf) nach Herstellerangaben bestimmt und mit einer BSA Eichgeraden abgeglichen.

Die Auftrennung der Proteinlysate erfolgte anhand ihres Molekulargewichtes in der SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE). Die verwendeten SDS-Polyacrylamid-Gele (7,5% Trenngel, 4% Sammelgel) wurden nach Standardprotokollen angefertigt (Sambrook et al., 2001). Die Zelllysate wurden mit 4x

Probenpuffer (200 mM Tris-HCl, pH 7,5; 40% Glycerin; 4% SDS, 0.004% Bromphenolblau; 500 mM β -Mercaptoethanol) versetzt und im Wasserbad für 5 min bei 100°C denaturiert. Als Protein-Größenmarker wurden 5 μ l des *Precision Plus Protein Standards* (Bio-Rad) verwendet. Die SDS-PAGE wurde in 1x Laemmli-Laufpuffer (25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 0,1% SDS) mit der *Mighty Small II* Elektrophoresekammer (Hoefer Scientific Instruments, USA) durchgeführt.

Für den Western Blot wurde die PVDF-Membran *Immobilon-P* (Millipore) und die oben genannte *Mighty Small II* Apparatur mit 1x Blot-Puffer (14,4 g Glycin; 3 g Tris; 200 ml Methanol; mit bidest. Wasser auf 1 l auffüllen) nach Herstellerangaben verwendet. Anschließend wurde die Membran mit PBST (0,2% Tween) mehrfach gewaschen und in 7% Milchpulver-PBST 1h geblockt. Die Primär-Antikörper wurden 1:5000 Anti-V5 (Maus monoklonal, Invitrogen) und 1:25 bis 1:200 Anti-Sulf1-103 bzw. Anti-Sulf2-106 (Kaninchen polyklonal, Eurogentec) eingesetzt (siehe Ergebnisteil Abb. 3.2.6). Die Peroxidase gekoppelten Sekundär-Antikörper (Anti-Rabbit-HRP bzw. Anti-Mouse-HRP, polyklonal Ziege, Oncogen) wurden 1:2000 eingesetzt und mit dem *Roti-Lumin Chemiluminescence substrate* (Roth) auf *Biomax* Röntgenfilmen (Kodak) nach Herstellerangaben detektiert.

2.2. Histologie und Skelettpräparation

2.2.1. Paraffinschnitte

Gewebeproben und Embryonen wurden in 4% PFA bei 4°C über Nacht fixiert, mit PBS gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (jeweils für 1 Stunde in 50%, 70%, 90%, 95% und dreimal in 100% Ethanol) dehydriert. Anschließend wurden die Proben dreimal in *UltraClearTM* (J.T.Baker, Xylolersatz) für insgesamt 1 Stunde und danach in 60°C warmen *UltraClearTM* / Paraffin Gemisch (1:1) für 30 min und schließlich in 60°C warmem Paraffin für 3 Stunden überführt. Um eine bessere Durchdringung des Gewebes zu erzielen, wurden alle Schritte ab 100% Ethanol mit angelegtem Vakuum im Entwässerungsautomat (TP1020, Leica) durchgeführt. Die Gewebeproben wurden an der Einbettstation EC350 (Microm) in Paraffin eingebettet. Von den erstarrten Paraffinblöckchen wurden mit dem *Mikrotom 2050 Supercut* (Reichert-Jung) 7 μ m dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger (Superfrost-Plus, Menzel GmbH) aufgezogen und bei 37°C über Nacht getrocknet.

2.2.2. Histologische Färbungen

Die Gewebeschnitte wurden für zweimal 10 min in *UltraClear*TM entparaffinisiert. Anschließend wurden die Gewebe über eine absteigende Ethanolreihe (100%, 90%, 70% Ethanol, jeweils 5 min) in Wasser überführt. Zur besseren Abgrenzung des Knorpels wurde mit einer Alcianblau-Lösung für 30 min gefärbt. Anschließend wurde mit einer Standard Hämatoxylin/Eosin-Färbung die Zellkerne bzw. das Bindegewebe nach Herstellerangaben (Sigma) angefärbt. Nach einer aufsteigenden Ethanolreihe und *UltraClear*TM wurde mit *Entellan* (Merck) eingedeckelt. Die Darstellung von calcifiziertem Gewebe erfolgte nach der *van Kossa*-Methode mit 1% Silbernitratlösung, gefolgt von einer Reduktion der Silberionen mit 5% Natriumcarbonat- / 10% Formaldehyd-Lösung und anschließender Fixierung in 5% Dinatriumthiosulfat-Lösung (Mundlos, 2000).

2.2.3. Bestimmung der Proliferationsrate

Objektträger mit Paraffinschnitten von E16,5 Radii wurden für 20 min auf 60°C erwärmt und anschließend mit *UltraClear*TM für dreimal 10 min entparaffinisiert und über eine absteigende Ethanolreihe in Natriumcitratpuffer (0,01 M, pH 6,0) überführt und für 10 min in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach dem Abkühlen wurde mit PBS gewaschen und die Schnitte mit Blockierungslösung (3% BSA, 0,1% Saponin in PBS) für 1 Stunde inkubiert. Der *anti-phospho-Histone H3 (Ser10)* Primär-Antikörper (Upstate, USA), welcher Zellen die sich in der M-Phase des Zellzyklus befinden markiert, wurde 1:200 mit Blockierungslösung verdünnt über Nacht bei 4°C aufgebracht. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde mit 5% FCS in PBS und 1:500 Anti-Kaninchen-Fluor546 Sekundär-Antikörper (Molecular Probes) und 1:1000 DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol, Roche) für 1 Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde am Mikroskop Leica DMR (Leica) DAPI und Fluor546 Fluoreszenz sowie Hellfeld-Aufnahmen angefertigt.

Am distalen Ende des längs geschnittenen E16,5 Radius (7 µm dick) wurde die Zone der proliferierenden Chondrozyten in die beiden Subzonen; Zone I (runde Chondrozyten) und Zone II (abgeflachte Chondrozyten) unterteilt. Zur Bestimmung der Zellzahl bzw. Zelldichte für Zone I und Zone II wurden DAPI gefärbte Zellkerne in jeweils zwei 0,01 mm² großen Bereichen auf mindestens 3 Längsschnitten von jeweils 10 Sulf1^{+/gt};Sulf2^{+/gt} bzw. 9 Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Tieren ausgezählt (Abb. 3.3.5.; Tab. 3.3.6). Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden alle phospho-Histon H3 positiven Zellkerne in Zone I und Zone II des Knorpels gezählt. Die Gesamtfläche der

Zone wurde mit der ImageJ Software ermittelt und die Anzahl der phospho-Histon H3 positiven Zellen pro Flächeneinheit ($0,01 \text{ mm}^2$) angegeben (Abb. 3.3.5; Tab. 3.3.7).

2.2.4. β -Gal-Färbung

Die Genetrapvektoren der Sulf1^{gt} und Sulf2^{gt} Mausmutanten, kodieren unter anderem den offenen Leserahmen für eine β -Galaktosidase. Dieses Enzym lässt sich durch eine Farbreaktion, bei der die gelbliche, lösliche Substanz X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D-Galaktopyranosid) in ein blaues, unlösliches Präzipitat umgewandelt wird im Gewebe nachweisen. Zunächst wurden die Embryonen mit einer Fixierlösung (1% Formaldehyd; 0,2% Glutaraldehyd; 0,02% NP40 in PBS für 30 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde diese anschließend mit X-Gal-Färbelösung (1 mM X-Gal, 2 mM MgCl_2 , 5 mM Kalium Ferricyanid, 5 mM Kalium Ferrocyanid in PBS) bei 30°C für 1 bis 2 Tage gefärbt. Zum Abstoppen der Farbreaktion wurde zweimal mit PBS gewaschen und mit 4% PFA für 30 min fixiert.

2.2.5. Knorpel- und Knochenfärbung von Skelettpräparationen

Skelettpräparationen von embryonalen und adulten Mäusen wurden mit einem modifizierten Protokoll (McLeod, 1980) gefärbt. Dabei wird durch Alcianblau der Knorpel blau und durch Alizarinrot mineralisiertes Gewebe und der Knochen rot dargestellt. Bei Mäuse-Embryonen älter als E16,5 und postnatalen Tieren wurde zunächst die Haut und die inneren Organe entfernt und für 2 Tage in 95% Ethanol gelagert. Danach wurde für mindestens 2 Tage mit Alcianblau-Färbelösung gefärbt. Anschließend wurde zweimal mit 95% Ethanol gewaschen und in eine absteigende Ethanolreihe (75%, 50% und 25% Ethanol, jeweils 2 Stunden) in 1% Kaliumhydroxid überführt. Die Färbung mit Alizarinrot-Lösung wurde je nach Farbintensität für 1 bis 3 Tage durchgeführt. Durch Waschen in 1% Kaliumhydroxid wurde die Färbung abgestoppt. In der nachfolgenden aufsteigenden Glycerol-Reihe (30%, 60%, 80% Glycerol in Wasser, jeweils 2 Tage) wurden die Präparate solange aufgeklärt bis die Muskulatur transparent erschien.

2.3. In situ-Hybridisierung

Mittels *in situ*-Hybridisierung (ISH) kann das Expressionsmuster eines Genes, d.h. die Verteilung der mRNA im Gewebe, nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden *in vitro*-transkribierte Digoxigenin (DIG) bzw. Biotin markierte antisense-RNA-Sonden für die ISH verwendet. Für die *in vitro* Transkription der antisense-RNA-

Sonden wurde die entsprechende Sp6-, T3- bzw. T7-RNA-Polymerase (Roche) verwendet (siehe letzte Spalte in Tab. 2.1 bis 2.3). Für die Transkriptionsreaktion wurde der *DIG RNA Labeling Mix* (Roche) nach Herstellerangaben verwendet. Die Ihh-Sonde für die zweifarbige ISH (siehe Ergebnisteil, Abb. 3.1.6.) wurde mit Biotin-16-UTP markiert (*Biotin RNA Labeling Mix*, Roche). Anschließend wurde die RNA mit 1/10 Volumen 4M Lithium-Chlorid und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol bei -20°C über Nacht gefällt. Nach der Zentrifugation wurde das RNA-Pellet in 100 µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert. Die Synthese-Ausbeute wurde mit einem Agarosegel kontrolliert.

Beim eigentlichen Hybridisierungsvorgang bindet die markierte antisense-RNA an die im Gewebe vorkommende (sense) mRNA des Zielgens. Die DIG- bzw. Biotin-Markierung wird anschließend durch Alkalische-Phosphatase (AP) gekoppelten Anti-DIG-Antikörper bzw. Streptavidin detektiert. Zur Detektion zweier unterschiedlicher Transkripte auf demselben Gewebeschnitt wurde gleichzeitig mit einer DIG- und einer Biotin-markierten antisense-RNA-Sonde hybridisiert. Die Detektion der DIG markierten RNA-Sonde erfolgte mit einem anti-DIG-AP-Antikörper (Roche) und BM-purple (Roche) als Farbsubstrat, welches durch die AP zu einem blau-violetten Präzipitat umgesetzt wird. Nach Inaktivierung der AP durch 4% PFA für 30 min wurde die Biotin markierte RNA-Sonde durch Streptavidin-AP (Roche) und dem Farbsubstrat INT/BCIP (Roche) als rot-oranges Präzipitat detektiert. Ein detailliertes Protokoll für die ISH an Gewebeschnitten ist in Abschnitt 2.3.2. und für *whole mount*-ISH (WISH) in Abschnitt 2.3.3. angegeben.

2.3.1. DNA-Templates der antisense-RNA Sonden

Für die Klonierung neuer DNA-Templates für antisense-RNA-Sonden wurden Bereiche mit geringer Homologie zu anderen Genen, meist im 3'-UTR des Zielgens, ausgewählt. Um Sequenzen mit häufig auftretenden Sequenzmotiven zu vermeiden, wurden die Bereiche mit Maus cDNA-Sequenzen der NCBI-GenBank verglichen (BLAST-Analyse). Teilweise wurden cDNA-Klone als sogenannte IMAGE clone (IC) Plasmide vom RZPD (Berlin) bezogen. Andere DNA-Templates wurden von isolierter *Mus musculus* cDNA bzw. gDNA mittels PCR amplifiziert und in den pCR4-TOPO Vektor (Invitrogen) kloniert. Für die Transkription der antisense-RNA wurden als DNA-Templates linearisierte Plasmide oder PCR-Produkte mit Sp6-, T3- bzw. T7-RNA-Polymerase Bindestelle verwendet (Tab. 2.1 bis 2.3).

Tabelle 2.1: ISH-Sonden für Sulfatasen.

Name der ISH-Sonde	Template DNA der ISH-Sonde	Anti-sense
ArsA #11	<i>Arylsulfatase A</i> (799 bp, 3'UTR) PCR-Produkt vom Plasmid (IC 3669438) mit Primer ArsA-F und T7-Primer (Anhang 8.2.4.).	T7-Pol.
ArsB #41	<i>Arylsulfatase B</i> (443 bp, CDS+3'UTR) PCR-Produkt vom Plasmid (ArsB-3'UTR clone 5A) mit Primer ArsB-F und M13-21-fwd (Anhang 8.2.5.).	T7-Pol.
ArsC #04	<i>Arylsulfatase C</i> (622 bp, CDS+3'UTR) PCR-Produkt vom Plasmid (IC 1381235) mit T7-Primer und T3-Primer (Anhang 8.2.6.).	T3-Pol.
ArsE #43	<i>Arylsulfatase E</i> (256 bp, 3'UTR) PCR-Produkt vom Plasmid (ArsE-3'UTR clone 8AA) mit Primer ArsE-F und M13-rev (Anhang 8.2.7.).	T3-Pol.
ArsG #16	<i>Arylsulfatase G</i> (926 bp, 3'UTR) PCR-Produkt vom Plasmid (IC 5134725) mit Primer ArsG-F und T7-Primer (Anhang 8.2.8.).	T7-Pol.
Arsl #47	<i>Arylsulfatase I</i> (885 bp, 3'UTR) PCR-Produkt vom Plasmid (IC 2802810) mit Primer Arsl-F und M13-rev (Anhang 8.2.1.).	T7-Pol.
Arsl-intern #84	<i>Arylsulfatase I</i> (850 bp, CDS) PCR-Produkt vom Plasmid (Arsl-CDS-stop clone C) mit Primer Arsl-879-F und M13-21-fwd (Anhang 8.2.1.).	T7-Pol.
ArsJ #52	<i>Arylsulfatase J</i> (645 bp, 5'UTR) PCR-Produkt vom Plasmid (ArsJ-5'UTR clone C) mit Primer ArsJ-F und M13-rev (Anhang 8.2.9.).	T3-Pol.
ArsK #20	<i>Arylsulfatase K</i> (795 bp, CDS) PCR-Produkt vom Plasmid (ArsK-3'UTR clone 20-1) mit Primer ArsK-F und M13-rev (Anhang 8.2.10.).	T3-Pol.
Galns #13	<i>Galaktosamin (N-Acetyl)-6-Sulfat Sulfatase</i> (1013 bp, 3'UTR) PCR-Produkt vom Plasmid (IC 3492664) mit Galns-F und T7-Primer (Anhang 8.2.11.).	T7-Pol.
Gns #54	<i>Glucosamin (N-Acetyl)-6-Sulfat Sulfatase</i> (945 bp, 3'UTR) PCR-Produkt vom Plasmid (Gns-3'UTR clone E), Primer Gns-F und M13-rev (Anhang 8.2.12.).	T3-Pol.
Ids #03	<i>Iduronat-2-Sulfatase</i> (1504 bp, CDS) PCR-Produkt vom Plasmid (IC 3025090) mit T3-Primer und T7-Primer (Anhang 8.2.13.).	T7-Pol.
Sgsh #18	<i>N-Sulfoglucosamin Sulfohydrolase</i> (518 bp, 3'UTR) PCR-Produkt vom Plasmid (Sgsh-3'UTR clone 18-4), Sgsh-F und T3-Primer (Anhang 8.2.14.).	T3-Pol.
Sulf1 #14	<i>Sulfatase 1</i> (1553 bp, 3'UTR) PCR-Produkt vom Plasmid (IC 4500954) mit Sulf1-F und T7-Primer (Anhang 8.2.2.).	T7-Pol.
Sulf1-intern #45	<i>Sulfatase 1</i> (273 bp, CDS) PCR-Produkt vom Plasmid (Sulf1-intern clone 2) mit Primer Sulf1-1453-F und M13-rev (Anhang 8.2.2.).	T3-Pol.
Sulf2 #15	<i>Sulfatase 2</i> (946 bp, 3'UTR) PCR-Produkt vom Plasmid (IC 3155559) mit Sulf2-F und Sp6-Primer (Anhang 8.2.3.).	Sp6-Pol.
Sulf2-intern #46	<i>Sulfatase 2</i> (285 bp, CDS) PCR-Produkt vom Plasmid (Sulf2-intern clone 2) mit Sulf2-1491-F und M13-21-fwd Primer (Anhang 8.2.3.).	T7-Pol.

Tabelle 2.2: ISH-Sonden für Col2-Sulf1^{tg199} deletierte Gene.

Name der ISH-Sonde	Template DNA der ISH-Sonde	Anti-sense
<i>Angpt1</i> #85	<i>Angiopoietin 1</i> (760 bp, CDS+3'UTR) PCR-Produkt vom Plasmid (Angpt1-3'UTR clone A) mit Primer Angpt1-F und M13-rev (Anhang 8.2.15)	T3-Pol.
<i>Eifs6</i> #86	<i>Elongationinitiation factor 3 subunit 6</i> (539 bp, CDS) PCR-Produkt vom Plasmid (Eif3s6-cp clone A) mit den Primer Eif3s6-F und M13-rev (Anhang 8.2.16.).	T3-Pol.
<i>Rspo2</i> #78	<i>R-spondin 2</i> (747 bp, 3'UTR) PCR-Produkt vom Plasmid (Rspo2-3'UTR clone 1A) mit den Primer Rspo2-F und Rspo2-R (Anhang 8.2.17.).	T3-Pol.
<i>Tmem74</i> #79	<i>Transmembran protein 74</i> (439 bp, 5'UTR) PCR-Produkt vom Plasmid (Tmem74-5'UTR clone 2A) mit den Primer Tmem74-F und Tmem74-R (Anhang 8.2.18.).	T7-Pol.
<i>Trhr</i> #87	<i>Thyrotropin-releasing hormone receptor</i> (707 bp, CDS) PCR-Produkt vom Plasmid (Trhr-cp clone A) mit den Primer Trhr-F und Trhr-R (Anhang 8.2.19.).	T3-Pol.
<i>Ttc35</i> #88	<i>Tetratricopeptide repeat domain 35</i> (330 bp, 3'UTR) PCR-Produkt vom Plasmid (Ttc35-3'UTR clone 3A) mit den Primer Ttc35-F und Ttc35-R (Anhang 8.2.20.).	T3-Pol.

Tabelle 2.3: ISH-Sonden für Markergene.

Name der ISH-Sonde	Template DNA der ISH-Sonde	Anti-sense
<i>Col2a1</i>	<i>Collagen type 2</i> (550 bp) <i>Hind</i> III linearisiertes pGEM-3Z Plasmid (Kohno et al., 1984)	T7-Pol.
<i>Col10a1</i>	<i>Collagen type 10</i> (400 bp) <i>Cl</i> al linearisiertes pBSK+ Plasmid (Jacenko et al., 1993)	T3-Pol.
<i>DispA</i> #05	<i>Dispatched A</i> (1143 bp, CDS) PCR-Produkt vom Plasmid (IC 5058375) mit T7-Primer und T3-Primer (Anhang 8.2.21.).	T3-Pol.
<i>Fgf8</i>	<i>Fibroblast growth factor 8</i> (550 bp, CDS) <i>Nde</i> I linearisiertes pBSK Plasmid (Minina et al., 2005)	T7-Pol.
<i>Ihh</i>	<i>Indian hedgehog</i> (1800 bp) <i>Xba</i> I linearisiertes pBSK Plasmid (Bitgood & McMahan, 1995)	T7-Pol.
<i>Ptch1</i>	<i>Patched 1</i> (500 bp) <i>Bgl</i> II linearisiertes pBKIIISK Plasmid (Goodrich et al., 1996)	T7-Pol.

Die Sequenzen der in Tab. 2.1 - 2.3 aufgelisteten Primer sind in Tab. 2.7 angegeben.

2.3.2. ISH an Paraffin Gewebeschnitten

Das ISH-Protokoll wurde in leicht abgewandelter Form wie in Brent et al. (2003) verwendet. Um RNAsen zu inhibieren wurden alle wässrigen Lösungen bis zum Hybridisierungsschritt am 1. Tag mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt.

1. Tag - Hybridisierung der antisense-RNA Sonde:

Die Paraffinschnitte (Abschnitt 2.2.1.) wurden bei 60°C für 1 Stunde erwärmt und danach zweimal mit *UltraClear*TM für 15 min entparaffinisiert und in einer absteigenden Ethanolreihe (2x 100%, 75%, 50%, 25% Ethanol) in PBS überführt. Anschließend wurde das Gewebe in 4% PFA für 10 min nachfixiert, dreimal in PBS gewaschen und mit 2 µg/ml (bei Stadien E10,5 - E12,5) bzw. 20 µg/ml (bei Stadien E13,5 - E16,5) Proteinase K (Roche) in PBS für 15 min behandelt. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurde erneut in 4% PFA für 5 min fixiert, dreimal in PBS gewaschen und mit frisch angesetztem 0,25% Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin pH 8,0 für 10 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen, wurden die Gewebe-Schnitte mit 100 µl ISH-Hyb-mix (50% Formamid, 10 mM Tris pH-Wert 7,5; 600 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,25% SDS; 10% Dextran Sulfat; 1x Denhardt's; 200 µg/ml Hefe-tRNA) bei 65°C für 3 Stunden präinkubiert. Anschließend wurde 1 µl DIG markierten antisense-RNA-Sonde (optional zusätzlich 1 µl Biotin markierte 2. Sonde) in 100 µl ISH-Hyb-Mix gelöst, auf den Gewebeschnitt gegeben über Nacht bei 65°C in einer feuchten Kammer, die feuchte (5x SSC / 50% Formamid) Papiertücher enthielt, hybridisiert.

2. Tag - Detektion der antisense-RNA-Sonde:

Die Objektträger wurden in 5x SSC gespült, mit 1x SSC/50% Formamid für 30 min bei 65°C und anschließend mit TNE für 10 min bei 37°C gewaschen. Die

unspezifisch gebundene (einzelssträngige) RNA wurde durch Behandlung mit RNase A (10 µg/ml in TNE) für 30 min bei 37°C entfernt. Nach erneutem Waschen mit TNE für 10 min bei 37°C und jeweils 20 min mit 2x SSC, 0,2x SSC und 0,2x SSC bei 65°C wurde zweimal mit MABT (MAB mit 0,05% Tween 20) bei Raumtemperatur für 5 min gewaschen. Danach wurden die Gewebeschnitte mit Blockierungslösung (1% *Blocking Reagent* (Perkin Elmer); 10% Schafserum in MAB mit 0,5% Tween 20) für 2 Stunden inkubiert und anschließend mit Anti-DIG-AP-Antikörper 1:2000 in Blockierungslösung über Nacht bei 4°C inkubiert.

3. Tag - Detektion:

Nach viermaligem Waschen mit MABT für 5 min und einmal mit NTMT pH 9,5 für 10 min wurde pro Objekträger 300µl BM-purple (Roche), versetzt mit 1 mM Levamisol (Sigma), direkt auf die Gewebeschnitte aufgebracht und im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach ausreichender Farbentwicklung, abhängig von der Sonde nach 3 Stunden oder bis zu 3 Tagen, wurde die Farbreaktion durch waschen in NTMT und zweimal mit PBS für jeweils 5 min und 4% PFA für 30 min abgestoppt und in *Kaisers Glyceringelantine* (Merck) eingedeckelt.

Optional: Die zweite antisense-RNA-Sonde (Biotin-markiert) wird im Anschluss an die PFA-Fixierung der ersten Farbreaktion (BM-purple für DIG-Sonde) durch folgende Schritte detektiert: zweimaliges Waschen in MABT je 5 min, Inkubation in Blockierungslösung für 2 Stunden und anschließend in Streptavidin-AP (Roche) 1:2000 in Blockierungslösung bei 4°C über Nacht. Danach viermal in MABT und einmal in NTMT pH 9,5 waschen und mit 0,75% INT/BCIP (Roche) in NTMT pH 9,5 mit 1 mM Levamisol im Dunkeln inkubieren. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde mit PFA wie oben beschrieben abgestoppt und eingedeckelt.

2.3.3. ISH an ganzen Embryonen (WISH)

Mittels *whole mount in situ*-Hybridisierung (WISH) können Gen-Expressionsmuster an intakten Embryonen (bis Stadium E14,5) dargestellt werden. Alle Waschschritte wurden auf einem Schüttel-Inkubator durchgeführt. Als Vorbereitung für die WISH wurden die Embryonen (E9,5 - E14,5) über Nacht in 4% PFA bei 4°C fixiert, dann zweimal mit PBST (PBS mit 0,1% Tween 20) gewaschen und in einer aufsteigenden Methanolreihe bei 4°C entwässert und bei -20°C gelagert.

1. Tag - Hybridisierung der antisense-RNA-Sonde:

Die Embryonen wurden in einer absteigenden Methanolreihe zu PBST rehydriert und mit 6% Wasserstoffperoxid in PBST für eine Stunde gebleicht. Danach wurde

mit Proteinase K 10 µg/ml (E9,5 - E11,5) bzw. 40 µg/ml (E12,5 - E14,5) in PBST für 10 min verdaut. Die Reaktion wurde mit Glycin (2 mg/ml in PBST) für 10 min und anschließender Fixierung in 4% PFA / 0,2% Glutaraldehyd in PBT für 20 min abgestoppt. Die Prähybridisierung mit WISH-Hyb-mix (50% Formamid; 0,1% Tween 20; 5x SSC pH-Wert 4,5; 100 µg/ml Heparin) erfolgte bei 65°C für 1 Stunde. Anschließend wurde mit 5 µl antisense-RNA Sonde pro 1 ml WISH-Hyb-Mix und Zusatz von 100 µg/ml Hefe-tRNA über Nacht bei 65°C hybridisiert.

2. Tag - Detektion der antisense-RNA-Sonde:

Die Embryonen wurden zweimal mit WISH-Hyb-mix für je 30 min bei 65°C gewaschen. Danach wurde in TNE für 20 min, TNE mit RNase A (10 µg/ml) für 40 min und TNE für 20 min bei 37°C gewaschen. Danach wurde zweimal mit 50% Formamid in 2x SSC pH-Wert 4,5 für 30 min bei 65°C und dann bei Raumtemperatur zweimal mit PBST und einmal mit MABT gewaschen. Danach wurde mit 5% *blocking reagent* (Roche) in MABT für eine Stunde geblockt und über Nacht mit anti-DIG-AP (1:5000 in 1% *blocking reagent* in MABT) inkubiert.

3. Tag - Waschschritte:

Nach dreimaligem waschen in MABT und achtmaligem Waschen in PBST tagsüber, wurden die Embryonen über Nacht mit 1 mM Levamisol (Sigma) in PBST bei 4°C gewaschen.

4. Tag - Detektion:

Nach dreimaligem Waschen in NTMT pH 9,5 (mit 1 mM Levamisol) für je 10 min wurde mit BM-purple (Roche) mit 1 mM Levamisol im Dunkeln bis zum Erreichen der gewünschten Farbintensität inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde zweimal mit NTMT pH 9,5 und einmal mit PBST jeweils für 10 min gewaschen und in 4% PFA / 0,2% Glutaraldehyd in PBS für 1 Stunde inkubiert.

2.4. Genetrap-Mausmutanten

Bei der Genetrap-Mutagenese werden embryonale Stammzellen (ES-Zellen) mit Genetrap-Vektoren transfiziert, welche zufällig im Genom der ES-Zelle integrieren. Liegt die Integrationsstelle in einem Intron, wird beim Spleißen der mRNA, anstelle des nächsten Exons dieses Gens, der Spleiß-Akzeptor des Genetrap-Vektors verwendet (Abb. 2.1). Infolgedessen fehlt der C-terminale Bereich des Proteins, wodurch ein idealerweise komplett bzw. teilweise (hypomorph) unfunktionelles Protein entsteht. Außerdem wird ein vom Genetrap-Vektor kodiertes β-Geo-Reporterprotein (β-Galaktosidase und Neomycin Phosphotransferase 2) an den C-

Terminus des Proteins angefügt. Durch die Neomycin Antibiotika-Resistenz können einzelne ES-Zelllinien selektioniert und expandiert werden. Die β -Galaktosidase kann dazu benutzt werden, um durch eine Farbreaktion Rückschlüsse über zell- bzw. gewebespezifische Expression des „getrapten“ Gens zu erhalten (Abschnitt 2.2.4.).

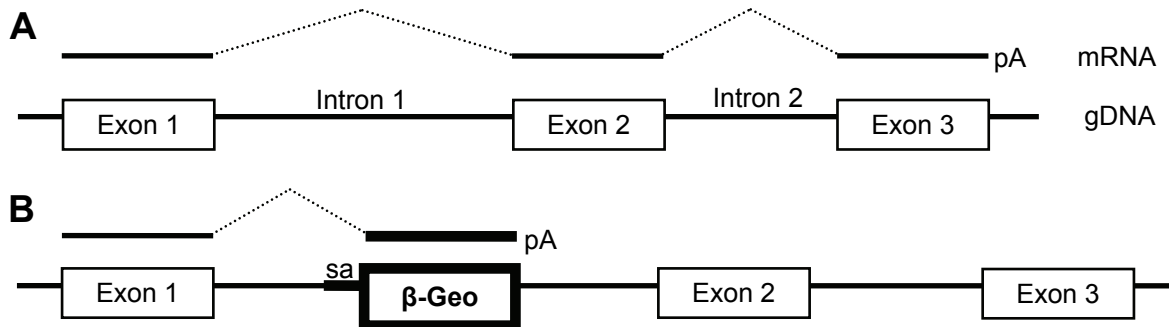


Abb. 2.1: Funktionsprinzip der Genetrap-Mutagenese.

(A) Beispiel eines genomischen DNA-Abschnitts, der ein Gen bestehend aus 3 Exons und 2 Introns enthält (unten) und davon abgeleitet ein polyadenosiliertes (pA) mRNA-Transkript (oben). Die gespleißte Intron-Sequenz ist durch eine punktierte Linie dargestellt. (B) Nach Integration des Genetrap-Vektors (β -Geo) in das erste Intron wird die mRNA vom Exon 1 auf den Spleiß-Akzeptor (sa) vom β -Geo und nicht auf das zweite Exon gespleißt, sodass ein verkürztes Transkript gebildet wird.

2.4.1. Sulf1^{gt} und Sulf2^{gt} Mausmutanten

Es wurden zwei ES-Zelllinien vom BayGenomics Consortium (San Francisco) bezogen (Stryke et al., 2003). Für die Sulf1^{gt} Mausmutanten wurde die Genetrap ES-Zelllinien XM190 (Sulf1^{Gt(pGT0Lxf)XM190Byg}) und für die Sulf2^{gt} Mausmutante die Linie PST111 (Sulf2^{Gt(pGT1TMpfs)PST111Byg}) verwendet. Beide Genetrap-Vektoren enthalten Teile des 1. Introns vom *Mus musculus* Engrailed 2 (en2) Gen, einem Spleiß-Akzeptor (sa), ein β -Geo-Reporterkonstrukt und ein Polyadenylierungssignal (pA) (Abb. 3.2.1). Der pGT1TM-PFS Vektor (im Sulf2 Gen) enthält im Unterschied zum pGT0Lxf Vektor (im Sulf1 Gen) eine CD4 Transmembrandomäne (tm) und eine interne Ribosomen Eintrittsstelle (IRES) gefolgt von der kodierenden Sequenz der plazentalen alkalischen Phosphatase (PLAP) (Abb. 3.2.1).

Am Max-Planck-Institut für Biochemie in München wurden diese Genetrap-ES-Zellen (entstammen dem 129/Ola Mausstamm) von Dr. Markus Moser in C57BL6-Maus-Embryonen injiziert und chimäre Mäuse generiert. Der 129/Ola Mausstamm trägt das dominante *agouti*-Allel (braune Fellfarbe) und die rezessiven Allele *pinkeye* (rote Augen) und *chinchilla* (Fellfarbe). Da die C57BL6-Mauslinie ein schwarzes Fell besitzt, konnten die chimären Founder Tiere (F0) leicht am gefleckten braunen Fell identifiziert werden. Nach Rückkreuzung auf C57BL6 konnten Tiere, welche

genetisches Material der 129/Ola ES-Zellen trugen, an der *agouti*-Fellfarbe identifiziert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Genetrap Mauslinien Sulf1^{gt} und Sulf2^{gt} wurden jeweils von einem männlichen Tier etabliert. Die Untersuchung des Skelettphänotypes wurde an Tieren durchgeführt die drei bis sechs Generationen (F3 bis F6) auf C57BL6 rückgekreuzt wurden.

2.4.2. Bestimmung der Genetrap-Vektor Integrationsstelle

Die genaue Integration des Genetrap-Vektors im Intron 1 von Sulf1 bzw. Intron 3 von Sulf2 wurde mittels PCR ermittelt. Hierfür wurde mit Sulf1^{+/gt} bzw. Sulf2^{+/gt} gDNA und eine Kombination aus neun verschiedenen Intron 1 spezifischen Vorwärtsprimer für Sulf1 bzw. sechs Intron 3 Vorwärtsprimer für Sulf2 und 4 Rückwärtsprimer für den Genetrap-Vektor verwendet (Primersequenzen nicht gezeigt). Bei der Sulf1^{+/gt} gDNA wurde eine 3 kb Bande mit Sulf1-In1-27k-F 5'-GATGTAGGCAACTGAGTAGCTAGC-3' und XM190-Gt-β-Geo-R1 5'-GACAGTATCGGCCTCAGGAAGATC-3' amplifiziert, kloniert und sequenziert (Anhang 8.4.1.). Bei der Sulf2^{+/gt} gDNA wurde eine 1,7 kb Bande mit Sulf2-In3-0k-F 5'-GCGCACTTCATCAATGCCTTCG-3' und PST111-Gt-980-R1 5'-CAGAAGCAGGCCACCCAACTG-3' amplifiziert und direkt sequenziert (Anhang 8.4.2.).

2.5. Überexpressions-Mausmutanten

2.5.1. Col2a1-Sulf1 und Col2a1-Sulf2 Mausmutanten

Für die Überexpression von Sulf1 und Sulf2 in transgenen Mäusen wurde der spezifisch in proliferierenden Chondrozyten aktive Col2a1-Promotor verwendet. Als Grundlage diente der von Sakai et al. (2001) beschriebene Col2a1-Expressionsvektor, bestehend aus 6,2 kb Col2a1-Promotor Sequenz (enthält Exon 1 und Teile vom Intron 1), ein synthetischer Spleiß-Akzeptor, die *EcoRV*-Klonierungsstelle und 1,2 kb Col2a1 Exon 52 mit dem Polyadenylierungssignal (Schema siehe Ergebnisteil, Abb. 3.5.1). Die Sulfatase-CDS mit Kozaksequenz und Stopcodon (Abschnitt 2.1.7.) wurde mittels *EcoRV* (Sulf1) bzw. *NruI* (Sulf2) Restriktionsverdau vom pCR4-TOPO Vektor getrennt und in den *EcoRV* linearisierten Col2a1-Expressionsvektor ligiert. Die richtige Orientierung des Inserts wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung bestätigt. Die Col2a1-Sulf1 und Col2a1-Sulf2 DNA-Konstrukte wurden mittels *NotI*- und *KpnI*-Verdau vom bakteriellen Teil des Col2a1-Expressionsvektors getrennt. Die circa 10 kb großen

linearisierten, Gel-gereinigten DNA-Konstrukte wurden von Herrn Ingo Voigt (Transgeneinheit am MPI für molekulare Genetik, Berlin) in den Vorkernbereich von befruchteten Eizellen (E0,5; FVB/N Mausstamm) injiziert und diese in scheinschwangere Empfängermäuse transferiert. Aus Schwanzspitzen der Jungtiere isolierte gDNA wurde mittels PCR auf im Genom integrierte Col2-Sulf DNA-Konstrukte getestet (Abschnitt 2.6.1 und 2.6.2.).

2.5.2. Bestimmung der Col2-Sulf1^{tg199} Integrationsstelle

Um flankierende genomische DNA (gDNA) Abschnitte der tg199-Integrationsstelle im Genom zu ermittelt, wurde die Methode der inversen PCR (iPCR) verwendet (Abb. 2.2). Hierzu wurde die gDNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aus der Leber eines transgenen Col2-Sulf1^{tg199} (FVB/N Stamm) Tieres isoliert und jeweils 10 µg gDNA mit folgenden Restriktionsendonukleasen verdaut: *Bgl*II, *Eco*RV, *Hind*III, *Mfe*I, *Nde*I, *Pvu*II, *Rsa*I, *Sac*I, *Spe*I und *Ssp*I. Um die Bildung von intramolekularen Ringschlüssen zu bevorzugen, wurde die geschnittene gDNA (0,5 µg) in einem großen Volumen (400 µl) über Nacht bei 16°C mittels 2 Units T4 DNA-Ligase ligiert. Anschließend wurde die Reaktion bei 80°C für 20 min hitzeinaktiviert. Jeweils 1 µl des Ligationsansatzes wurde für die PCR-Reaktionen mit verschiedenen Primerkombinationen verwendet. Die PCR-Produkte wurden Agarosegel-gereinigt und in einer zweiten PCR mit identischen Primern weiter amplifiziert, erneut Gel-gereinigt und direkt sequenziert.

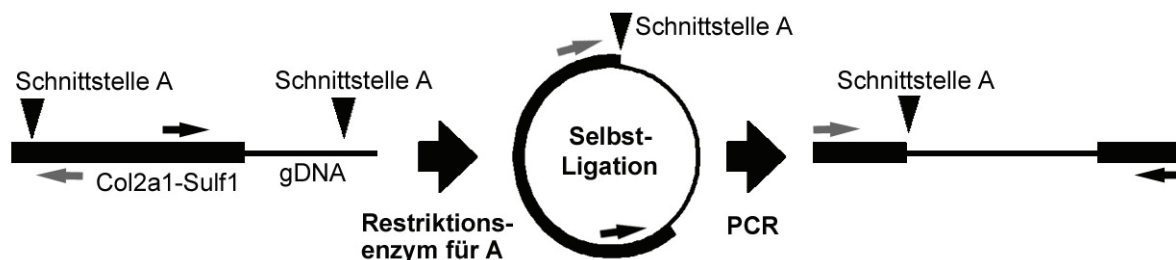


Abb. 2.2: Schema der inversen PCR.

Zur bekannten DNA-Sequenz des Col2a1-Sulf1 Konstrukts (dicke Linie) werden 2 entgegengesetzt gerichtete Primer ausgewählt (schwarzer bzw. grauer Pfeil), welche zwischen einer Schnittstelle A für eine DNA-Endonuklease und dem Ende des Col2a1-Sulf1 Konstruktes liegen. Neben der Integrationsstelle im Genom liegt (zufälligerweise) eine weitere Schnittstelle A (gDNA, Bild links). Zunächst wird die Col2-Sulf1^{tg199} genomische DNA mit einem Restriktionsenzym für die Schnittstelle A inkubiert. Die DNA-Fragmente werden anschließend durch eine DNA-Ligase mit sich selbst ligiert. Durch diesen intramolekularen Ringschluss sind nun die Primerbindungsstellen (schwarzer bzw. grauer Pfeil) zueinander ausgerichtet (mittleres Bild). In einer PCR-Reaktion und den entsprechenden Primern wird nun die unbekannte genomische DNA (dünne Linie) zusammen mit den beiden flankierenden bekannten DNA-Abschnitten (dicke Linie) amplifiziert und kann anschließend sequenziert werden (Bild rechts).

Es wurden drei Bereiche mittels iPCR amplifiziert. (1.) Die 3'-iPCR lieferte eine 1,3 kb Bande mit den Primern iPCR-Col2-mid-F und iPCR-Sulf1-mid-R ausgehend von *RsaI*-verdauter gDNA. (2.) Bei der 5'-iPCR lieferten zwei Ansätze flankierende Sequenzen zur tg199-Integrationsstelle. Zum einen wurde eine 2,7 kb Bande mit den Primern Sulf1-2413-F und Col2-4714-R und *MfeI*-geschnittener gDNA und zum anderen eine 2,3 kb Bande mit den Primern Col2-6352-F und Col2-5130-R und *RsaI* geschnittener gDNA amplifiziert. (3.) Bei der 42Mb-iPCR konnte eine 2,0 kb Bande mit den Primern iPCR-42M-350-F und iPCR-42M-1020-R aus der *HindIII*-geschnittenen gDNA amplifiziert werden. Die Sequenzen der amplifizierten gDNA-Bereiche sind im Anhang 8.4.3. und die Primersequenzen in Tab. 2.8. angegeben. Ein Schema der tg199 Integration ist im Ergebnisteil 3.5. (Abb. 3.5.7) gezeigt.

2.6. Genotypisierung der Mausmutanten

Die PCR erfolgte in einem 25 µl Reaktionsansatz: 2,5 µl 10x PCR-Puffer (MBI Fermentas, 15 mM MgCl₂), 0,2 µl dNTP (10 mM), je 2 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (10 pmol / µl), 1 µl gDNA (1:10 verdünnt, Abschnitt 2.1.1.), 0,1 µl Taq-DNA-Polymerase, 17,2 µl bidest. Wasser. Die DNA-Sequenzen der verwendeten Primer sind in der Tabelle 2.9 angegeben.

2.6.1. Col2-Sulf1 Genotypisierung

Sulf1 überexprimierende Mäuse unter der Kontrolle des Kollagen Typ 2 alpha 1 (Col2a1) Promotors wurden mittels PCR mit den Primern Sulf1-2413-F und Col2-vec-R2 als 231 bp Bande auf dem 1%igen Agarosegel identifiziert. Das PCR-Programm umfasste: 94°C für 30'', 58°C für 30'' und 72°C für 50'' für insgesamt 37 Zyklen.

2.6.2. Col2-Sulf2 Genotypisierung

Die transgenen Col2-Sulf2 Mäuse wurden mit den PCR-Primern Sulf1-1453-F und Sulf1-1725-R als 285 bp Bande identifiziert. Da beide Primer im kodierenden Bereich von Sulf1 liegen wird auch der endogene Sulf1 Locus, der ein Intron enthält, als 1152 bp Bande bei Wildtyp-Mäusen amplifiziert. Die PCR-Bedingungen waren: 94°C für 30'', 61°C für 30'' und 72°C für 60'' für insgesamt 34 Zyklen.

2.6.3. Shh Genotypisierung

Bei der *Sonic hedgehog* (Shh) Mausmutante ist das Shh Exon 2 durch eine Neomycin Kasette ersetzt (Chiang et al., 1996). Das mutierte Shh-Allel der Shh^{+/-} und Shh^{-/-} Tiere wurde mit den PCR-Primern Shh-geno-F2 (bindet in Neomycin

Kassette) und Shh-geno-R2 (bindet im Shh Intron 2) als circa 900 bp Bande nachgewiesen. Die PCR-Bedingungen waren: 94°C für 40'', 59°C für 40'' und 72°C für 50'' für insgesamt 35 Zyklen. Die Unterscheidung der Shh^{+/-} und Shh^{-/-} Tiere erfolgte mit einer PCR auf das Wildtyp Shh-Allel mit den im Exon 2 gelegenen Primern Shh-wt-ex2-F2 und Shh-wt-ex2-R2 als circa 230 bp Bande. Die PCR-Bedingungen waren: 94°C für 30'', 60°C für 30'' und 72°C für 50'' für 35 Zyklen.

2.6.4. Sulf1^{gt} Genotypisierung

Das Wildtyp Sulf1-Allel (Sulf1⁺) wurde mit den Primern XM190-geno-F1 und XM190-geno-R1-wt in der PCR als 338 bp Bande nachgewiesen. Das XM190 Genetrap-Allel (Sulf1^{gt}) wurde mit dem gleichen Vorwärtsprimer XM190-geno-F1 und dem Rückwärtsprimer XM190-Gt-β-Geo-R1 der im pGT0lxf Genetrap-Vektor bindet, als 539 bp Bande identifiziert. Die Primer für die Sulf1⁺ und Sulf1^{gt} PCR wurden in der selben PCR-Reaktion verwendet (*multiplexed PCR*) und ergaben bei: Sulf1^{+/+} nur 338 bp, Sulf1^{+/gt} 338 und 539 bp, Sulf1^{gt/gt} nur 539 bp Bande. Das PCR-Programm war: 94°C für 30'', 63°C für 30'' und 72°C für 50'' mit insgesamt 34 PCR-Zyklen.

2.6.5. Sulf2^{gt} Genotypisierung

Die Sulf2^{gt} Genotypisierungs-PCR wurde analog zur Sulf1^{gt} PCR durchgeführt, als Primer für das Wildtyp Sulf2-Allel (Sulf2⁺) wurde PST111-geno-F1 und PST111-geno-R1-wt verwendet (211 bp), während für das PST111 Genetrap-Allel (Sulf2^{gt}) die Primer PST111-geno-F1 und PST111-Gt-980-R1 (bindet im pGT1TM-PFS Genetrap) eingesetzt wurden (576 bp). Die einzelnen Genotypen lieferten folgende Banden: Sulf2^{+/+} nur 211 bp, Sulf1^{+/gt} 211 und 576 bp, Sulf1^{gt/gt} nur 576 bp.

2.7. Zellkultur

Die verwendeten Säugerzelllinien CHO (*chinese hamster ovary*) und COS-1 Zellen wurden in *Dulbecco's modified Eagle Medium* (DMEM 4,5 g/l Glucose) mit 10% FCS, 1 mM L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Hühnerfibroblasten-Zelllinie DF-1 wurde in DMEM (1 g/l Glucose) mit 10% FCS und 2% Hühnerserum, 1 mM L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit *Lipofectamin 2000* (Invitrogen) nach Herstellerangaben.

2.8. RCAS-ArsI Produktion und Injektion in Hühnerembryonen

Der verwendete replikationskompetente Retrovirus (RCAS-BPA) basiert auf dem Rous-Sarcoma-Virus und besitzt die Eigenschaft Hühnerzellen (jedoch nicht Säugerzellen) mit sehr hoher Effizienz zu infizieren. Er kann dazu benutzt werden, um eine beliebige kodierende Gensequenz (< 2 kb) im Genom der Wirtszelle zu integrieren und das entsprechende Protein zu exprimieren (Logan & Tabin, 1998; Himly et al., 1998). Mit dem RCAS-ArsI Plasmid transfizierte DF-1 Hühnerfibroblasten wurden auf sechs Zellkulturschalen (Durchmesser 15 cm) expandiert und für die Virusernte in serumreduziertem Medium (DMEM mit 1% FCS; 0,2% Hühnerserum; 1 mM L-Glutamin; 1% Penicillien/Streptomycin) kultiviert. Das Medium wurde an drei aufeinander folgenden Tagen abgenommen, durch einen 0,45 µm Filter sterilfiltriert und in der Ultrazentrifuge (Beckmann L7.55, Rotor SW27) bei 22.000 rpm für 3 h bei 4°C zentrifugiert. Die pelletierten Viruspartikel wurden in einem geringen Mediumrest resuspendiert und als 25 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Der Virustiter wurde durch eine Verdünnungsreihe des Aliquots bestimmt. Mit dieser wurden DF-1 Zellen infiziert und mit dem Anti-RCAS-3C2-Antikörper detektiert (Logan & Tabin, 1998). Der verwendete RCAS-ArsI Virus hatte einen Titer von 10^7 Infektionseinheiten/ml. Zur Infektion der Hühnerembryonen wurden befruchtete SPF-Hühnereier (Charles River) für 4,5 Tage bis zum Stadium HH 21-23 (Hamburger & Hamilton, 1951) bebrütet. Anschließend wurde die Eierschale vorsichtig geöffnet und der RCAS-ArsI Virus mithilfe eines Mikroinjektors in die rechte Flügelanlage injiziert. Danach wurde die Öffnung in der Schale mit Klebeband verschlossen und für weitere 5,5 Tagen im Brutschrank (Ehret) inkubiert.

2.9. Materialien

2.9.1. Reagenzien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Sigma oder Roth bezogen. Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma MBI Fermentas verwendet.

<i>Blocking Reagent</i>	Perkin Elmer
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma
DMEM	BioWhittacker
FCS (fötales Kälberserum)	Biochrom AG
Hühnerserum	Gibco
<i>Lipofectamin 2000</i>	Invitrogen
<i>peqGOLD TriFast</i>	PeqLab
Proteinase K	Roche
RNAse A, DNase-frei	Roche
<i>UltraClearTM</i> (Xylolersatz)	J.T.Baker

Fertigreagensätze (Kits)

BCA-Protein Assay Kit	Pierce, USA
Biotin RNA Labeling Mix (#1685597)	Roche
DIG RNA Labeling Mix (#1277073)	Roche
Gel Extraction Kit Qiaquick	Qiagen
Plasmidisolierung Maxi	Qiagen
Plasmidisolierung Mini	A&A Biotechnology, Polen
SYBR green PCR Master Mix	Applied Biosystems
TaqMan Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems

Antikörper

Maus Anti-RCAS-3C2-Antikörper (Logan & Tabin, 1998)
 Kaninchen Anti-phospho-Histone H3 (Ser10) Antikörper (#06-570, Upstate, USA)
 Ziege Anti-Kaninchen-Fluor546 Sekundär-Antikörper (Molecular Probes)
 Streptavidin-AP (#1089161, Roche)
 Anti-DIG-AP-Antikörper (#1093274, Roche)

2.9.2. Lösungen

Die Zusammensetzung von Lösungen für spezielle Anwendungen ist in den entsprechenden Abschnitten im Methodenteil angegeben.

Tabelle 2.4: Allgemeine Lösungen

Name	Zusammensetzung der Lösung
MAB	100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; pH-Wert 7,5 mit NaOH einstellen
NTMT pH 9,5	100 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 9,5; 50 mM MgCl ₂ ; 0,05% Tween 20
Alcianblau-Färbelösung	150 mg Alcian blue 8GX (#A5268, Sigma) in 800 ml 100% Ethanol und 200 ml Eisessig lösen, durch Papiertuch filtern
Alizarinrot-Färbelösung	50 mg Alizarin red S (#A5533, Sigma) in 1000 ml 1% Kaliumhydroxid lösen
PBS (10x)	80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na ₂ HPO ₄ ; 2,4 g KH ₂ PO ₄ auf 1 l Wasser; pH-Wert 7,4
PBST	PBS mit 0,1% Tween 20
4% PFA	4% Paraformaldehyd in PBS; pH-Wert 7,4 mit HCl einstellen
SSC (20x)	175,3 g NaCl; 88,2 g Na-Zitrat auf 1 l Wasser; pH-Wert 7,0
TNE	10 mM Tris pH 7,5; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA

2.9.3. Vektoren und Plasmide

Klonierungs- und Expressionsplasmide:

Col2a1-Expressionsvektor	- Sakai et al. (2001)
pcDNA3.1/V5-His-B	- Invitrogen
pCMV-SPORT6	- RZPD, Invitrogen
pCR4-TOPO	- Invitrogen
pT7T3D-PacI	- RZPD
RCAS-BPA	- Logan & Tabin (1998); Anhang 8.3.

IMAGE clone (IC) mit *Mus musculus* cDNA-Sequenzen vom RZPD (Berlin):

ArsA (IC 3669438, IMAGp998C078861)	in pCMV-SPORT6	
ArsC (IC 1381235, IMAGp998E123487)	in pT7T3D-PacI	
ArsG (IC 5134725, IMAGp998P2211330)	in pCMV-SPORT6	
ArsI (IC 2802810, IMAGp998E196936)	in pT7T3D-PacI	- (Anhang 8.2.1.)
DispA (IC 5058375, IMAGp998C1611158)	in pT7T3D-PacI	
Galns (IC 3492664, IMAGp998M178538)	in pCMV-SPORT6	
Ids (IC 3025090, IMAGp998C117485)	in pT7T3D-PacI	
Sgsh (IC 5338911, IMAGp998L1611860)	in pCMV-SPORT6	
Sulf1 (IC 4500954, IMAGp998I1910367)	in pCMV-SPORT6	- (Anhang 8.2.2.)
Sulf2 (IC 3155559, IMAGp998O167643)	in pCMV-SPORT6	- (Anhang 8.2.3.)

In dieser Arbeit klonierte *Mus musculus* Genfragmente (Primer siehe Tabelle 2.7):

Angpt1-3'UTR (clone A) in pCR4-TOPO enthält 760 bp *Angiopoietin 1*, amplifiziert aus gDNA mit Primer Angpt1-F und Angpt1-R (Anhang 8.2.15.).

ArsB-3'UTR (clone 5A) in pCR4-TOPO enthält 443 bp *Arylsulfatase B*, amplifiziert aus gDNA mit Primer ArsB-F und ArsB-R (Anhang 8.2.5.).

ArsE-3'UTR (clone 8AA) in pCR4-TOPO enthält 256 bp *Arylsulfatase E*, amplifiziert aus gDNA mit Primer ArsE-F und ArsE-R (Anhang 8.2.7.).

ArsI-CDS-stop (clone C) in pCR4-TOPO enthält ein PCR-Produkt der vollständigen CDS, die mit MmArsI-Nrul-F und MmArsI-Nrul-R Primer von Plasmid (IC 2802810) amplifiziert wurde.

ArsJ-5'UTR (clone C) in pCR4-TOPO enthält 645 bp *Arylsulfatase J*, amplifiziert aus gDNA mit Primer ArsJ-F und ArsJ-R (Anhang 8.2.9.).

ArsK-3'UTR (clone 20-1) in pCR4-TOPO enthält 795 bp *Arylsulfatase K*, amplifiziert aus cDNA mit Primer ArsK-F und ArsK-R (Anhang 8.2.10.).

Eif3s6-cp (clone A) in pCR4-TOPO enthält 539 bp *Elongationinitiation factor 3 subunit 6*, amplifiziert aus cDNA mit Primer Eif3s6-F und Eif3s6-R (Anhang 8.2.16.).

Gns-3'UTR (clone E) in pCR4-TOPO enthält 945 bp *Glucosamin (N-Acetyl)-6-Sulfat Sulfatase*, amplifiziert aus cDNA mit Primer Gns-F und Gns-R (Anhang 8.2.12.).

Rspo2-3'UTR (clone 1A) in pCR4-TOPO enthält 747 bp *R-spondin 2*, amplifiziert aus gDNA mit Primer Rspo2-F und Rspo2-R (Anhang 8.2.17.).

Sgsh-3'UTR (clone 18-4) in pCR4-TOPO enthält 518 bp *N-Sulfoglucosamin Sulfohydrolase*, amplifiziert aus Plasmid (IC 5338911) mit Primer Sgsh-F und Sgsh-R (Anhang 8.2.14.).

Sulf1-intern (clone 2) in pCR4-TOPO enthält 273 bp *Sulfatase 1*, amplifiziert aus Plasmid (IC 4500954) mit Primer Sulf1-1453-F und Sulf1-1725-R (Anhang 8.2.2.).

Sulf2-intern (clone 2) in pCR4-TOPO enthält 285 bp *Sulfatase 2*, amplifiziert aus Plasmid (IC3155559) mit Primer Sulf2-1491-F und Sulf2-1775-R (Anhang 8.2.3.).

Tmem74-5'UTR (clone 2A) in pCR4-TOPO enthält 439 bp *Transmembran protein 74*, amplifiziert aus gDNA mit Primer Tmem74-F und Tmem74-R (Anhang 8.2.18.).

Trhr-cp (clone A) in pCR4-TOPO enthält 707 bp *Thyrotropin-releasing hormone receptor*, amplifiziert aus gDNA mit Primer Trhr-F und Trhr-R (Anhang 8.2.19.).

Ttc35-3'UTR (clone 3A) in pCR4-TOPO enthält 330 bp *Tetratricopeptide repeat domain 35*, amplifiziert aus gDNA mit Primer Ttc35-F und Ttc35-R (Anhang 8.2.20.).

Die Arsl, Sulf1 und Sulf2 Expressionsplasmide mit Stopcodon bzw. ohne Stopcodon im pcDNA3.1-V5-His Vektor, sowie die jeweiligen Vorläuferplasmide im pCR4-TOPO Vektor, sind in Abschnitt 2.1.7ff. beschrieben.

2.9.4. Oligonukleotid-Primer

Die Primersequenzen sind in 5' → 3' Orientierung angegeben. Vorwärtsprimer sind durch (-F) und Rückwärtsprimer durch (-R) als Namensendung gekennzeichnet.

Tabelle 2.5: Primer für qPCR, qRT-PCR und RT-PCR.

Primernamen	Primersequenz (5' → 3')	Verwendung
RT-Col2-Ex1-F	GCTGGTGCTGCTGACGCTGCTC	RT-PCR Col2a1-Sulf1/2
RT-Sulf1-113-R	CGTTCTCTGCTGTATCCTTCCTCG	RT-PCR Col2a1-Sulf1
RT-Sulf2-126-R	GATGTTCTCTGCGGTCCCTCTG	RT-PCR Col2a1-Sulf2
RT-ArsB-1101-F	TGGAACCAAACTCTGGATG	qRT-PCR ArsB
RT-ArsB-1250-R	TCGTCCCTTTGCTGGAGTCAT	qRT-PCR ArsB
RT-ArsI-239-F	AGGGCGTCAAACTGGAGAAT	qRT-PCR ArsI
RT-ArsI-350-R	CGGATAATGGAGTGCTGCAA	qRT-PCR ArsI
RT-ArsJ-213-F	GACGCCCCACCCTTGATAAAC	qRT-PCR ArsJ
RT-ArsJ-343-R	AATGCTGAAGTCCCGTGTGT	qRT-PCR ArsJ
RT-Gapdh-F	GGGAAGCCCATCACCATCTT	qRT-PCR Gapdh
RT-Gapdh-R	CGGCCTCACCCCATTTG	qRT-PCR Gapdh
RT-Gns-532-F	CTCTCCATCAACGGGAAGG	qRT-PCR Gns
RT-Gns-621-R	GAAGTCCAGGGAGAGGTTGG	qRT-PCR Gns
RT-Hprt1-Ex7-F	CAGGCCAGACTTTGTTGGAT	qRT-PCR Hprt1
RT-Hprt1-Ex9-R	GCGCTCATCTTAGGCTTTGT	qRT-PCR Hprt1
RT-Hs6st1-F	CAACTGTGTGCCCGGTGT	qRT-PCR Hs6st1
RT-Hs6st1-R	CACTCAGGTAGCGGGATACG	qRT-PCR Hs6st1
RT-Hs6st2-F	CCAGGCTGAGACCTTCCAG	qRT-PCR Hs6st2
RT-Hs6st2-R	TGCTTTCCAAGTTGCTCCTC	qRT-PCR Hs6st2
RT-Hs6st3-F	CACAGCCACACCAGGAATTT	qRT-PCR Hs6st3
RT-Hs6st3-R	CGTCGCACATATGGAGAGAG	qRT-PCR Hs6st3
RT-Sulf1-Ex12-F	GATACCAGACAGCCTGTGAGC	qRT-PCR Sulf1
RT-Sulf1-Ex13-R	GAGTAGAGGTTGCGTGCATTC	qRT-PCR Sulf1
RT-Sulf2-Ex11-F	TGGACGCCGTAAGCTCTTTA	qRT-PCR Sulf2
RT-Sulf2-Ex12-R	GGCTGAGGCACAGTATCCAA	qRT-PCR Sulf2
C15-42M-LF	GCCTTCTCTTCATCCTCTGG	qPCR 42Mb-L
C15-42M-LR	CACGAAGTGGCCTTACCATT	qPCR 42Mb-L
C15-42M-RF	CACAGTGAGCGGTCTCTTCTT	qPCR 42Mb-R
C15-42M-RR	GGTAGGGCAAGTAGGAGACAA	qPCR 42Mb-R
C15-43M-F	CCCTGCAGGATGTTCTGACT	qPCR 43Mb
C15-43M-R	CTGTTGCTGTCTCCCTCACA	qPCR 43Mb
C15-44M-LF	CCATATTGTGTGCGTTGAGG	qPCR 44Mb-L
C15-44M-LR	TGAAGGTCAGCTAGCAGCAA	qPCR 44Mb-L
C15-44M-RF	AGCCTTGAAGGGAGAGGAAG	qPCR 44Mb-R
C15-44M-RR	TTGGCTCTGAAACACAGTGG	qPCR 44Mb-R
C15-88M-LF	GCCTCAGGCTGAATGCTAAC	qPCR 88Mb-L
C15-88M-LR	TCTGGTCCCGAGAACTTGAC	qPCR 88Mb-L
C15-88M-RF	CTGTGTAGGCTGCGAAGTGA	qPCR 88Mb-R
C15-88M-RR	GATGGAGCTTAGGGTGTTC	qPCR 88Mb-R
Col2-1247-F	GGGCACTGCAGACTTAAAGC	qPCR 1k-Col2
Col2-1338-R	CACCTTCCCAGGCTATTCAA	qPCR 1k-Col2
Col2-3775-F	AAATGTGTCCCCAAGAGCAC	qPCR 4k-Col2
Col2-3874-R	CTGACCCCATATCCATCCAC	qPCR 4k-Col2
Col2-9119-F	GATCTGCACTGAATGGCTGA	qPCR 9k-Col2
Col2-9218-R	TCTGCCAGTTTCAGGTCTCT	qPCR 9k-Col2

Abkürzungen in der Spalte "Verwendung": qRT-PCR (quantitative RT-PCR für cDNA-Proben), qPCR (quantitative PCR für gDNA-Proben) oder RT-PCR (semiquantitative RT-PCR für cDNA, d.h. Analyse der PCR-Produkte auf einem Agarosegel).

Tabelle 2.6: Primer zur Klonierung der Expressionskonstrukte.

Primername	Primersequenz (5' → 3')	Verwendung
MmSulf1-EcoRV-F	<u>AGATATC</u> GCCACCATGAAGTATTCCTCTGG	Klonierung, mit Kozak
MmSulf1-EcoRV-R	<u>AGATATC</u> GGACTGACTAACCTTCC	Klonierung, mit Stop
MmSulf1-SacII-R	<u>ACCGCGG</u> ACCTTCCCATCCATCCCATAAC	Klonierung, ohne Stop
MmSulf2-NruI-F	<u>ATCGCGA</u> GCCACCATGGCACCCCTGGCCTGC	Klonierung, mit Kozak
MmSulf2-NruI-R	<u>ATCGCGA</u> CTTAGCCTTCCCAACCTTCC	Klonierung, mit Stop
MmSulf2-SacII-R	<u>ACCGCGG</u> GCCTTCCCAACCTTCCCATAG	Klonierung, ohne Stop
MmArsI-NruI-F	<u>ATCGCGA</u> GCCACCATGCATGCTCTCTCAGGAT	Klonierung, mit Kozak
MmArsI-NruI-R	<u>ATCGCGA</u> TCAGATCCGGTGGGACATC	Klonierung, mit Stop
MmArsI-SacII-R	<u>ACCGCGG</u> GATCCGGTGGGACATCAGC	Klonierung, ohne Stop
V5-Stop-R	TCAACCCGTAGAATCGAGACCGAGGAG	Klonierung, mit V5

Start- (ATG) und Stop-codons (komplementär zu TAA, TAG, TGA) sind unterstrichen. Restriktionsschnittstellen (*EcoRV*, *NruI*, *SacII*) sind Fett gedruckt.

Tabelle 2.7: Primer für DNA-Templates der ISH-Sonden.

Primername	Primersequenz (5' → 3')	Verwendung
Angpt1-F	GTTGGTGGTTCGATGCCTGTG	PCR Angpt1 3'UTR; ISH-Sonde
Angpt1-R	CTTCTACCCCCAACTCTTATCCTC	PCR Angpt1 3'UTR
ArsA-F	CTACAGATCTGCTGTCAGC	PCR ArsA 3'UTR; ISH-Sonde
ArsB-F	CTCCGTCTCAGTCCAACGTCTC	PCR ArsB 3'UTR; ISH-Sonde
ArsB-R	GCCAACAGCAAGATCCTTCCAG	PCR ArsB 3'UTR
ArsE-F	CTTCCTGTGGGACCGGAAGTG	PCR ArsE 3'UTR; ISH-Sonde
ArsE-R	CATTTTCATTGAAACAGGAAGTCCCG	PCR ArsE 3'UTR
ArsG-F	GACATCGCTGATGACAACA	PCR ArsG 3'UTR; ISH-Sonde
ArsI-F	GTCGCCGCAAGAAGAAATGCAAG	PCR ArsI 3'UTR; ISH-Sonde
ArsI-879-F	CTTCTCCAGTGACAATGGT	PCR ArsI intern; ISH-Sonde
ArsJ-F	GATTGACAAACGCTCAGCGG	PCR ArsJ 5'UTR; ISH-Sonde
ArsJ-R	CCATTCACTCTGGTCCCACAG	PCR ArsJ 5'UTR
ArsK-F	CTCAGACCATGGAGAGATGG	PCR ArsK 3'UTR; ISH-Sonde
ArsK-R	GCTGTGAGCTACTGGTGGAT	PCR ArsK 3'UTR
Eif3s6-F	CCATCCAAAGGGCCGTGATAAC	PCR Eif3s6; ISH-Sonde
Eif3s6-R	CTTGCTGGTAGGGCGAGACTG	PCR Eif3s6
Galns-F	GTAACCAGGCTGTCATGAA	PCR Galns 3'UTR; ISH-Sonde
Gns-F	GCGTCAGAACGAGAAGGTTC	PCR Gns 3'UTR; ISH-Sonde
Gns-R	CTGGAACCGAGTTTCGCCAC	PCR Gns 3'UTR
Rspo2-F	GTGCACAAAGCTACTCTCCAG	PCR Rspo2 3'UTR; ISH-Sonde
Rspo2-R	CTTACGGTTAGAATCAAGCCC	PCR Rspo2 3'UTR
Sgsh-F	GGAGCAATGGAGGCAGTAC	PCR Sgsh 3'UTR; ISH-Sonde
Sgsh-R	CAGAGCCCAGATAGACCAC	PCR Sgsh 3'UTR
Sulf1-F	GACAGTTATGGGATGGATG	PCR Sulf1 3'UTR; ISH-Sonde
Sulf1-1453-F	GTCCGTGAGAATGCACGCAACC	PCR Sulf1 intern; ISH-Sonde
Sulf1-1725-R	GCGCTTGGCAATGCTCCTTGG	PCR Sulf1 intern;
Sulf2-F	CCAGAAATGAAGAGACCTTC	PCR Sulf2 3'UTR; ISH-Sonde
Sulf2-1491-F	CAAGTATGACGGCCAGAGCAGC	PCR Sulf2 intern; ISH-Sonde
Sulf2-1775-R	CCACCAGTACCACTGAACTGCC	PCR Sulf2 intern;
Tmem74-F	GCCTTCTCATTTGAGGGATTC	PCR Tmem74 5'UTR; ISH-Sonde
Tmem74-F	GGGTCCACTGGGCTGTTCCT	PCR Tmem74 5'UTR
Trhr-F	GAGTCCCCGTGTCAGAGAAG	PCR Trhr; ISH-Sonde
Trhr-R	GGAATGGGGTTTAAGAAGAGGAT	PCR Trhr
Ttc35-F	GCAGGTGCAAGTAAGAAGGA	PCR Ttc35 3'UTR; ISH-Sonde
Ttc35-R	GTAGGGGTGATATACGAGGATG	PCR Ttc35 3'UTR
M13-21-fwd	CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT	PCR ISH-Sonde
M13-rev	AGCGGATAACAATTTACACAGGA	PCR ISH-Sonde
SP6-Primer	CTATTTAGGTGACACTATAG	PCR ISH-Sonde
T3-Primer	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	PCR ISH-Sonde
T7-Primer	TAATACGACTCACTATAGGGA	PCR ISH-Sonde

Tabelle 2.8: Primer für inverse PCR der tg199-Mausmutante.

Primernamen	Primersequenz (5' → 3')	Verwendung
Col2-4714-R	CAGATGCAGAAATCGTAAGAGACCG	5' iPCR tg199
Col2-5130-R	GCATACAGAGCCCGATTACACAG	5' iPCR tg199
Col2-6352-F	CCGTTCGGTCCCAGAGGTTTC	5' iPCR tg199
Sulf1-2413-F	GATCCTTATCAGCTCACAAATACAG	5' iPCR tg199
iPCR-Col2-mid-F	CATAGGGCCTGTCTGCTTCTTGT	3' iPCR tg199
iPCR-Sulf1-mid-R	GTGCGGGTCATAGTTTCCTCCTTC	3' iPCR tg199
iPCR-42M-350-F	AGTCTAAGGAAGGAGCTTTCATA	42Mb-iPCR tg199
iPCR-42M-1020-R	GTTTAAGCAGCTTCTTCCAGAG	42Mb-iPCR tg199

Tabelle 2.9: Primer zur Genotypisierung der Mauslinien.

Primernamen	Primersequenz (5' → 3')	Verwendung
XM190-geno-F1	GTGGACATGGGTGCACAGATACAC	XM190 (Sulf1) Wildtyp/GT PCR
XM190-geno-R1-wt	CTTCATTTTCAGGAGTGTGTGGTAGG	XM190 (Sulf1) Wildtyp PCR
XM190-Gt-β-Geo-R1	GACAGTATCGGCCTCAGGAAGATC	XM190 (Sulf1) GT PCR
PST111-geno-F1	CGCGTGTTAGAGGTCTCGTAGG	PST111 (Sulf2) Wildtyp/GTPCR
PST111-geno-R1-wt	GCTGTTCAGGGTGCTTGAGCCA	PST111 (Sulf2) Wildtyp PCR
PST111-Gt-980-R1	CAGAAGCAGGCCACCCAACCTG	PST111 (Sulf2) GT PCR
Shh-geno-F2	CGTTGGCTACCCGTGATATT	Shh neo allel PCR
Shh-geno-R2	TAGGAGACAGCCTCGGAAGA	Shh neo allel PCR
Shh-wt-ex2-F2	TTAAATGCCTTGGCCATCTC	Shh Wildtyp PCR
Shh-wt-ex2-R2	CAGTGGATGTGAGCTTTGGA	Shh Wildtyp PCR
Sulf1-2413-F	GATCCTTATCAGCTCACAAATACAG	Col2-Sulf1 Genotypisierung
Col2-vec-R2	GGTCTTCTGTGATCGGTATCAAGC	Col2-Sulf1 Genotypisierung
Sulf2-1491-F	CAAGTATGACGGCCAGAGCAGC	Col2-Sulf2 Genotypisierung
Sulf2-1775-R	CCACCAGTACCACTGAACTGCC	Col2-Sulf2 Genotypisierung

2.9.5. Zelllinien

- CHO - Hamster (*Cricetulus griseus*) Ovar Zelllinie (DSMZ)
- CHO Sulf1-A2-2 - stabil exprimierende Sulf1-V5/His CHO Zelllinie (Götttert, 2005)
- CHO Sulf2-A5 - stabil exprimierende Sulf2-V5/His CHO Zelllinie (Götttert, 2005)
- COS-1 - Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) Nieren Zelllinie (DSMZ)
- DF-1 - Hühner (*Gallus gallus*) Fibroblasten Zelllinie (ATCC, USA)

2.9.6. Organismen

<i>E. coli</i> Top10	- Bakterienstamm (Invitrogen) [<i>F</i> - <i>mcrA</i> <i>D</i> (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) <i>f80lacZDM15</i> <i>DlacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> <i>D</i> (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (<i>StrR</i>) <i>endA1</i> <i>nupG</i>]
<i>E. coli</i> XL1-blue	- Bakterienstamm (Stratagene) [<i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [<i>F'</i> <i>proAB</i> <i>lacIqZAM15</i> <i>Tn10</i> (<i>Tetr</i>)]
<i>Gallus gallus</i>	- befruchtete Hühnereier, SPF (Charles River)
<i>Mus musculus</i> C57BL6	- Wildtyp-Mäuse (Charles River)
<i>Mus musculus</i> FVB/N	- Wildtyp-Mäuse (Charles River)
<i>Mus musculus</i> Col2-Sulf1	- Sulfatase 1 transgene Überexpression Mauslinien #79 und #80 (siehe Ergebnisteil 3.5.)
<i>Mus musculus</i> Col2-Sulf2	- Sulfatase 2 transgene Überexpression Mauslinien #199 und #208 (siehe Ergebnisteil 3.5.)
<i>Mus musculus</i> Shh ⁻	- Sonic hedgehog Exon 2 Deletions Mutante (Chiang et al., 1996)
<i>Mus musculus</i> Sulf1 ^{gt}	- Sulfatase 1 Genetrap Insertionsmutante (siehe Ergebnisteil 3.2.1.; Ratzka et al., 2008)
<i>Mus musculus</i> Sulf1 ⁻	- Sulfatase 1 Exon 5, entspricht dem 2. codierenden Exon, Deletionsmutante (Lamanna et al., 2006)
<i>Mus musculus</i> Sulf2 ^{gt}	- Sulfatase 2 Genetrap Insertionsmutante (siehe Ergebnisteil 3.2.1.; Ratzka et al., 2008)
<i>Mus musculus</i> Sulf2 ⁻	- Sulfatase 2 Exon 2, entspricht dem 1. codierenden Exon, Deletionsmutante (Lamanna et al., 2006)

2.9.7. Datenbanken und Software

Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated) für die Bildbearbeitung
 Lasergene Programmpaket (DNASar) für die DNA- und Proteinsequenzanalyse
 bestehend aus: EditSeq, MapDraw, MegAlign, Protean, SeqManII
 ImageJ 1.37 (Wayne Rasband) zur Bildanalyse: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
 Microsoft Office Programmpaket (Microsoft) bestehend aus: Excel, Word
 NCBI DNA und Protein Sequenzdatenbanken und BLAST-Analyse (Altschul et al., 1990) online: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
 Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) für das Primerdesign, online Version: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>
 RepeatMasker (Smit & Green, nicht publiziert) zur Identifizierung von repetitiven DNA-Sequenzen, online: <http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>
 RZPD cDNA Klon (IMAGE clone) sind unter <http://www.imagenes-bio.de/> abrufbar.
 SDS 2.1 Software ABI PRISM (Applied Biosystems) für die Auswertung der quantitative RT-PCR.

3. Ergebnisse

3.1. Unterteilung der Sulfatase-Genfamilie

Im vollständig sequenziertem Genom der Maus (*Mus musculus*) sind 14 Sulfatase-Gene annotiert (Sardiello et al., 2005). Der Kenntnisstand zu den einzelnen Mitgliedern dieser Genfamilie ist allerdings sehr unterschiedlich. Beispielsweise sind die Arylsulfatasen A (ArsA), ArsB und ArsC hinsichtlich ihrer Kristallstruktur, des natürlichen Substrates und der biologischen Funktion gut untersucht. Währenddessen von anderen Sulfatasen wie z.B. ArsG, Arsl, ArsJ und ArsK kaum mehr als die DNA- und Protein-Sequenzen bekannt sind (Hanson et al., 2004).

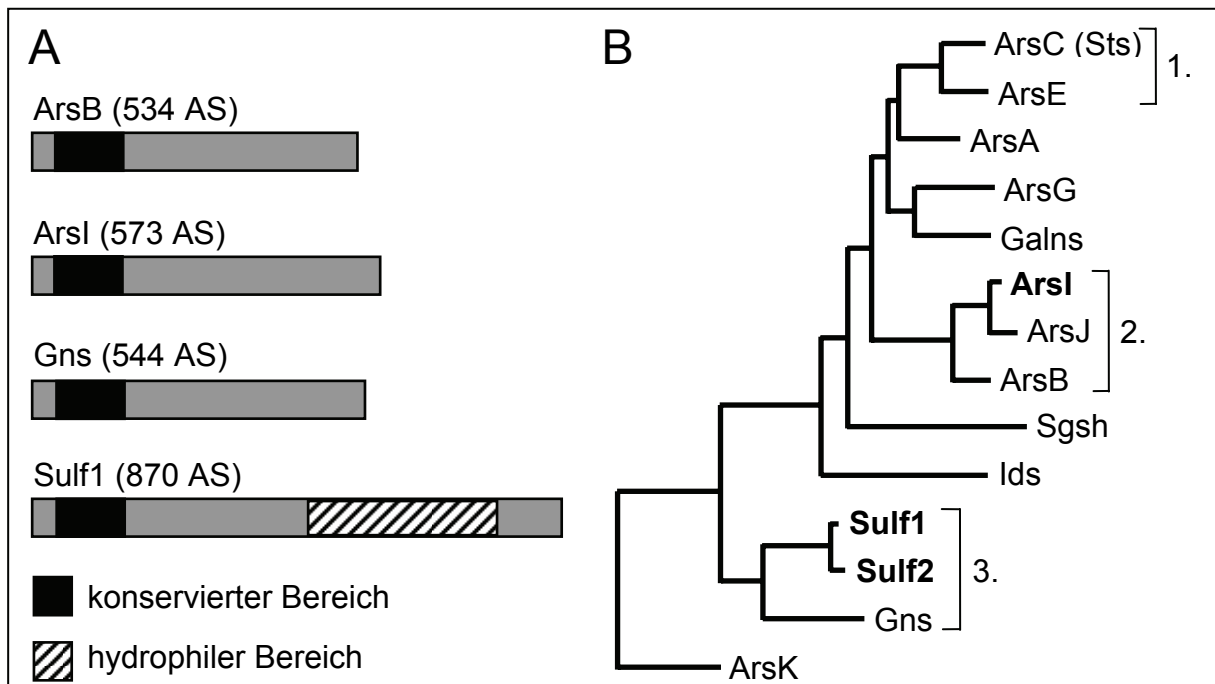


Abb. 3.1.1: Genstruktur und Verwandtschaftsverhältnisse der Maus-Sulfatasen.

(A) Schematische Darstellung der ArsB, Arsl, Gns und Sulf1 Genprodukte. Die schwarze Box im N-Terminus stellt die Lage des 115 Aminosäure (AS) umfassenden konservierten Bereichs dar. Der ausschließlich bei Sulf1 und Sulf2 vorkommende hydrophile Bereich von ca. 300 AS ist schräg gestreift dargestellt. (B) Das Dendrogramm zeigt Ähnlichkeiten zwischen den 14 Maus-Sulfatasen auf. Es lassen sich drei Gruppen abgrenzen, siehe Text. Die in dieser Arbeit näher untersuchten Sulfatasen Arsl, Sulf1 und Sulf2 sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Um einen Überblick über die Verwandtschaftsverhältnisse (Homologien) der einzelnen Sulfatasen zueinander zu erhalten, wurden konservierte Bereiche der Proteinsequenzen, welche einen Teil des katalytischen Zentrums enthalten, mit dem Programm MegAlign (DNASTar) untereinander verglichen (Abb. 3.1.1A; Anhang 6.1.). Davon ausgehend wurde ein Dendrogramm erstellt (Abb. 3.1.1B). Bei dieser Darstellungsform ist die Länge der horizontalen Linien proportional zur Anzahl der

unterschiedlichen Aminosäuren, d.h. kurze Linien wie zwischen Sulf1 und Sulf2 veranschaulichen eine hohe Ähnlichkeit in der Proteinsequenz, während längere Linien wie zwischen Sulf1 und Gns oder Sulf1 und Ids auf größere Unterschiede in der Sequenz hinweisen. An diesem Dendrogramm (Abb. 3.1.1B) lassen sich drei Gruppen von nahe verwandten Sulfatasen abgrenzen. (1.) Die erste Gruppe besteht aus ArsE und der gut untersuchten ArsC, die auch als Steroid-Sulfatase (Sts) bezeichnet wird. Die ArsE Gen-Sequenz der Maus ist außerhalb des konservierten Bereichs nur partiell bekannt. Hingegen ist die humane ArsE besser untersucht, da sie für die Erkrankung Chondrodysplasia punctata 1 verantwortlich ist (Franco et al., 1995). Ob das natürliche Substrat der ArsE ebenfalls aus Steroiden wie bei der ArsC besteht, ist jedoch nicht bekannt. (2.) Zur zweiten Gruppe gehören ArsB, Arsl und ArsJ, wobei ArsB Chondroitinsulfat und Dermatansulfat abbaut und die beiden anderen Sulfatasen kaum charakterisiert sind. Die nahe Verwandtschaft zur ArsB könnte auf ähnliche Substratspezifitäten hindeuten, jedoch sind biochemische Untersuchungen an gereinigten Enzymen nötig, um diese Hypothese zu prüfen. (3.) Die dritte Gruppe umfasst die drei Heparansulfat-6-O-Sulfatasen Gns, Sulf1 und Sulf2. Die Gns, als so genannte Exosulfatase, spaltet die 6-O-Sulfatgruppen vom nicht-reduzierenden Ende, der beim HS-Abbau im Lysosom entstehenden, HS-Oligosaccharide ab. Im Gegensatz dazu katalysieren die Endosulfatasen Sulf1 und Sulf2 die Hydrolyse der 6-O-Sulfatgruppen innerhalb der intakten HS-Ketten (Ai et al., 2006). Wie an der längeren Linie im Dendrogramm erkennbar ist, weist ArsK die größten Unterschiede zu allen anderen Sulfatasen auf. Obwohl diese Veränderungen auch einige der hochkonservierten Aminosäurepositionen betreffen (siehe Anhang 6.1.), wird ArsK dennoch zur Familie der Sulfatasen gezählt (Einzelheiten siehe Obaya, 2006). Vergleicht man die Verwandtschaftsverhältnisse (Topologie) der 14 murinen Sulfatasen (Abb. 3.1.1B) mit dem Dendrogramm der 17 humanen Sulfatasen (Obaya, 2006) so findet sich eine gute Übereinstimmung zwischen beiden Arbeiten.

3.1.1. Expressionsmuster der Sulfatasen im Mäusembryo

Um einen Überblick über die Gen-Expression der Sulfatasen zu erhalten, wurden für alle 14 Gene Digoxigenin markierte antisense-RNA-Sonden generiert (Methodenteil 2.3.). Diese Sonden wurden in einem ersten *in situ*-Hybridisierungs-Screen an parasagital geschnittenen E12,5 und E14,5 Mäuse-Embryonen eingesetzt (Abb. 3.1.2). Von den 14 getesteten *in situ*-Sonden zeigten dabei 7 Sonden regional

spezifische Signale und 2 Sonden eine ubiquitäre Expression. Die Sonden für *ArsA*, *ArsC*, *ArsK* und *Sgsh* lieferten selbst nach längerer Expositionszeit (> 3 Tage) kaum detektierbare Färbungen und wurden daher nicht weiter verwendet. Die *ArsE*-Sonde wurde ebenfalls nicht weiter eingesetzt, da diese bereits nach einer Stunde eine gleichmäßig über den Gewebeschnitt verteilte, intensive Färbung lieferte. Dies ist jedoch als unspezifische Färbung zu werten, da zum einen nach eigenen Erfahrungswerten die Farbentwicklung selbst für sehr stark exprimierte Gene wie z.B. *Col2a1* oder *Col10a1* mindestens 2-3 Stunden dauert und zum anderen ein regional spezifisches Expressionsmuster für *ArsE* im Hühnerembryo beschrieben wurde (Ferrante et al., 2004).

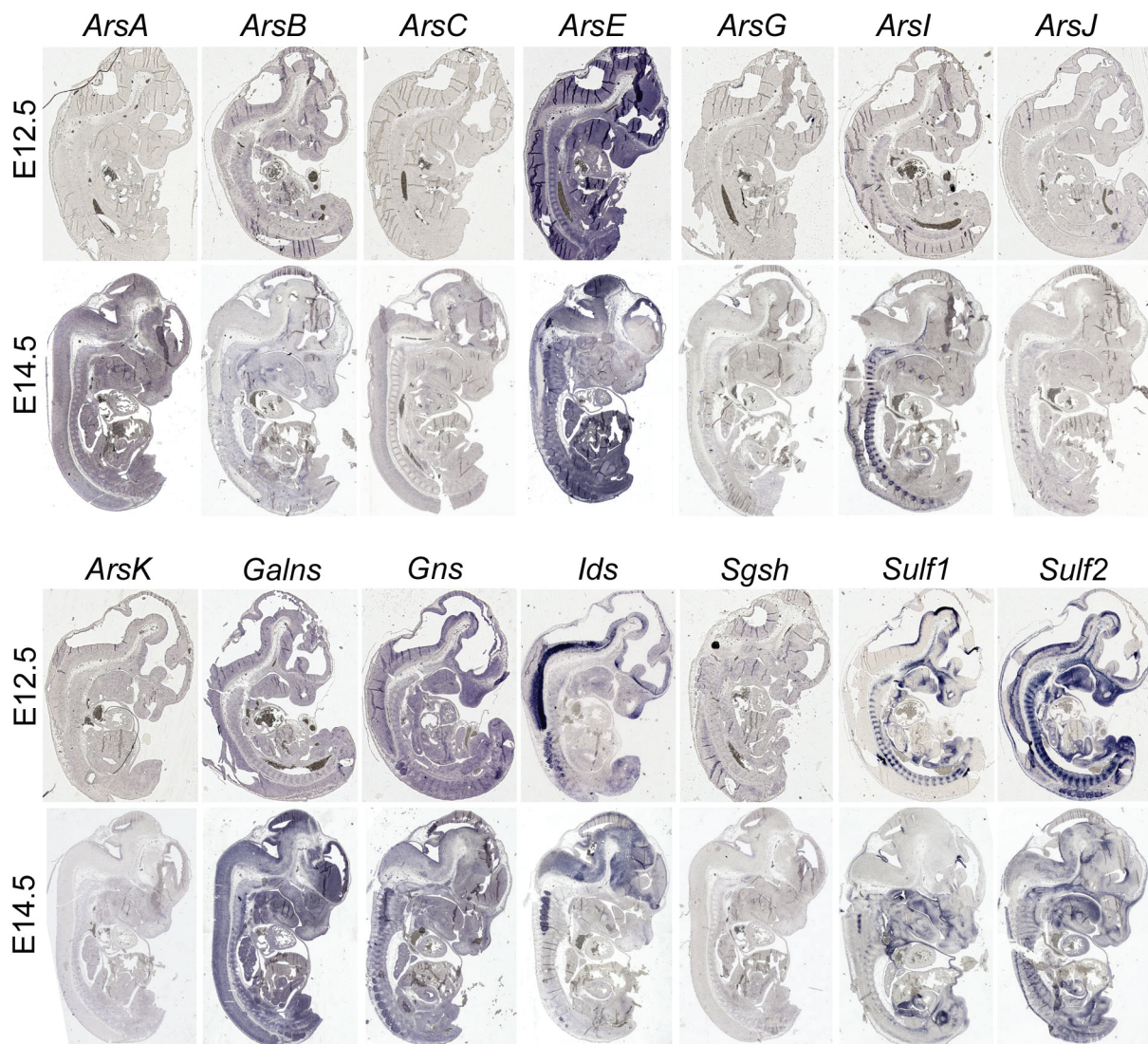


Abb. 3.1.2: Expressionsmuster der 14 Sulfatasen an parasagittal Schnitten von E12,5 und E14,5 Maus-Embryonen.

Für sieben Sonden *ArsB*, *Arsl*, *ArsJ*, *ArsG*, *Ids*, *Sulf1*, *Sulf2* wurden gewebespezifische Signale detektiert. Die Expression von *Galns* und *Gns* ist ubiquitär. Für vier Gene *ArsA*, *ArsC*, *ArsK* und *Sgsh* konnte kein spezifisches Expressionsmuster entdeckt werden. Die *ArsE*-Sonde lieferte bereits nach einer Stunde eine unspezifische Färbung, welche als Artefakt einzuschätzen ist.

In einer nachfolgenden Hybridisierung wurden die Sulfatase-Sonden an Frontalschnitten von E14,5 Mäuseköpfen verwendet (Abb. 3.1.3 und 3.1.4).

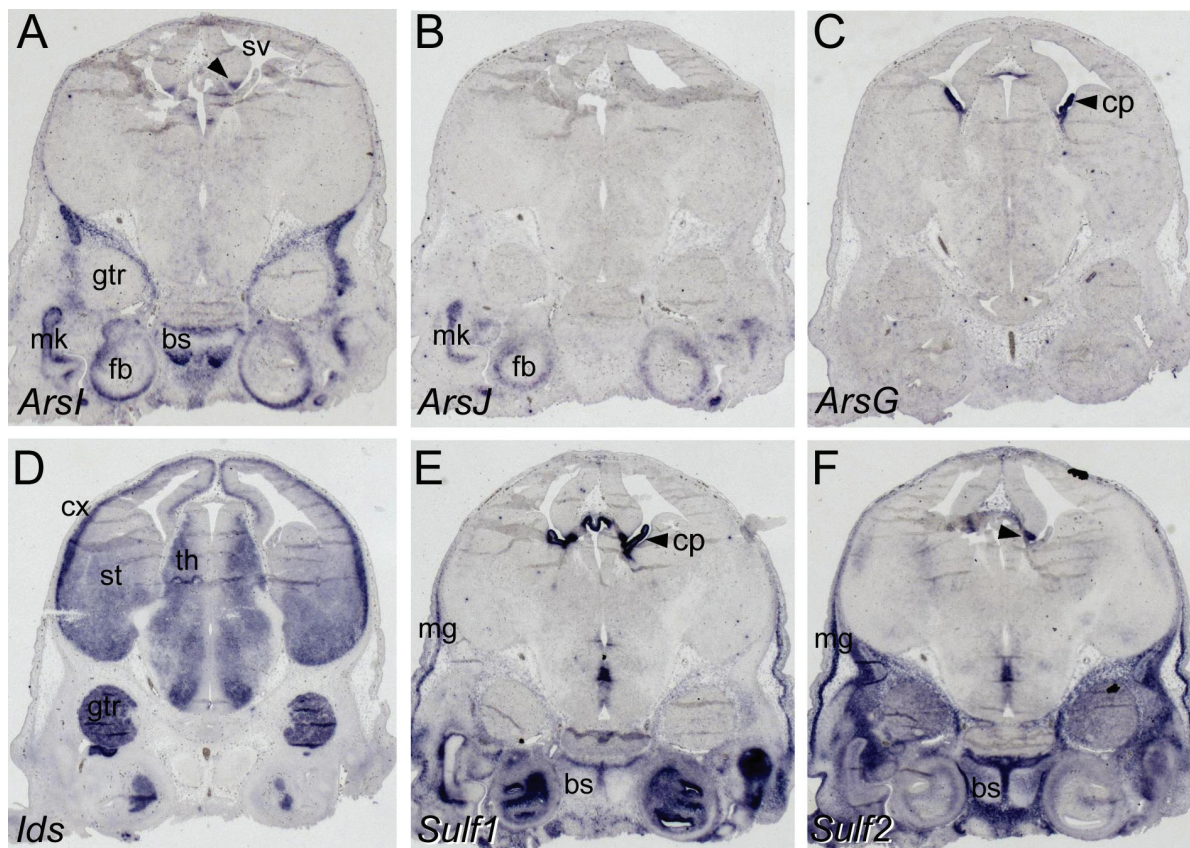


Abb. 3.1.3: Expression von Sulfatasen in der Kopfregion von E14,5 Embryonen. (A) *Arsl* wird in einer äußeren Schicht von Chondrozyten und (B) *ArsJ* benachbart dazu im Inneren der Knorpel-Anlagen von Felsenbein (fb) und Meckelschen Knorpel (mk), welcher hier in den Malleus übergeht, exprimiert. (C) Die *ArsG* wurde im Choroid plexus (cp) nachgewiesen. In diesem Gewebe sind *Sulf1* (E) und benachbart dazu *Arsl*- und *Sulf2*-Transkripte exprimiert (Pfeilspitzen in A und F). (D) *Ids* wird von verschiedenen neuronalen Geweben exprimiert, z.B. im Cortex (cx), Striatum (st), Thalamus (th) und im Ganglion trigeminale (gtr). (E,F) *Sulf1* und *Sulf2* sind im mesenchymalem Gewebe (mg), z.B. unterhalb der Haut, co-exprimiert. Weitere Abkürzungen: Basisphenoid (bs), Felsenbein (fb), Seitenventrikel (sv).

ArsJ und *Sulf2* sind in den Chondrozyten des Felsenbeins (enthält das Innenohr) und Meckelschen Knorpels überlappend exprimiert. Benachbart dazu wird *Arsl* in diesen Knorpel-Anlagen exprimiert (Abb. 3.1.3A,B,E). *ArsG* wird spezifisch im Choroidplexus der Hirnventrikel exprimiert (Abb. 3.1.3C). Diese bisher kaum untersuchte Sulfatase konnte in keinem anderen Gewebe von E12,5 und E14,5 Embryonen detektiert werden (Abb. 3.1.2). *Sulf1* ist ebenfalls im Choroidplexus exprimiert (Abb. 3.1.3E), jedoch umfasst die Expression auch benachbarte Strukturen, in denen eine Überlappung mit der Expression von *Arsl* und *Sulf2* besteht (Pfeilspitzen in Abb. 3.1.3A,F). Des Weiteren wird *Sulf1* im Innenohr (innerhalb des Felsenbeins) exprimiert (Abb. 3.1.3E). *Ids* wird im Gehirn, besonders im Cortex und

Striatum (Abb. 3.1.3D), sowie in weiteren neuronalen Strukturen wie z.B. Rückenmark und Spinalganglien (Abb. 3.1.2) exprimiert. *Sulf2* ist ebenfalls im Gehirn exprimiert, jedoch mit einer stärkeren regionalen Beschränkung (Daten nicht gezeigt). Eine detaillierte Expressionsanalyse von *Sulf2* bei Ratten-Embryonen ist in Nagamine et al. (2005) beschrieben.

Im sich entwickelnden Auge (E14,5 und E16,5) sind bei sechs Sulfatasen regional spezifische Färbungen zu erkennen. Von diesen sind *Ars1*, *Galns*, *Gns* und *Sulf1* im Linsenepithelium exprimiert (Abb. 3.1.4A-D,G-I). Die im gesamten Embryo ubiquitär exprimierte *Gns* ist verstärkt im Pigmentschicht-Epithelium des Auges (Abb. 3.1.4C) und der Bodenplatte (*floorplate*) des Rückenmarks exprimiert (Daten nicht gezeigt). Die innere neuroblastische Schicht der Retina exprimiert *Ids* und die äußere neuroblastische Schicht *Sulf2* (Abb. 3.1.4K,L).

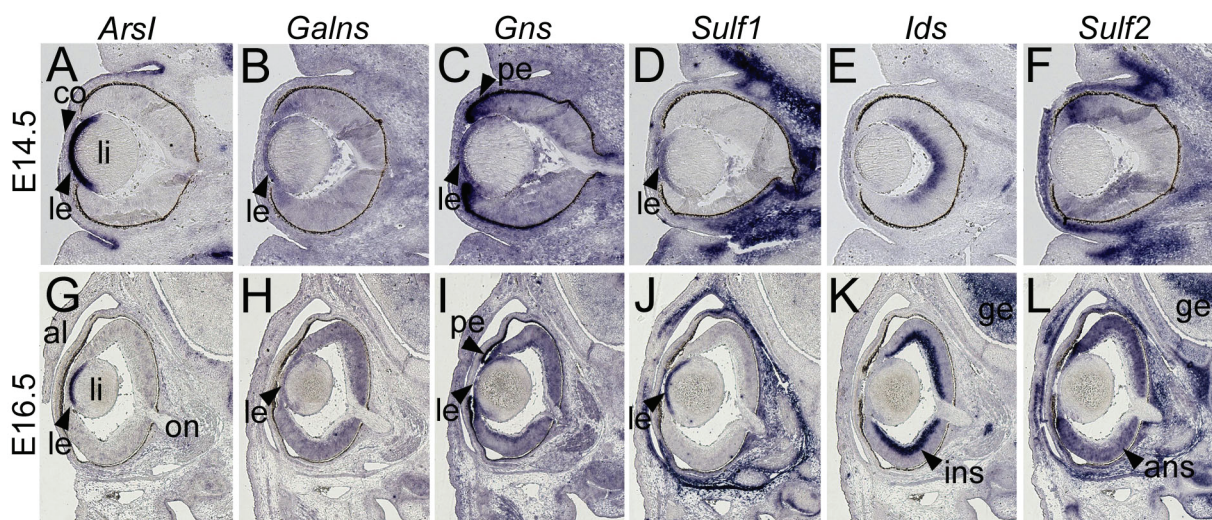


Abb. 3.1.4: Expression von Sulfatasen in den embryonalen Augenanlagen.

Antisense-RNA *in situ*-Hybridisierung für *Ars1* (A,G), *Galns* (B,H), *Gns* (C,I), *Sulf1* (D,J), *Ids* (E,K) und *Sulf2* (F,L) an coronal geschnittenen Augen von E14,5 (obere Reihe) und E16,5 (untere Reihe) Embryonen. Die Sulfatasen *Ars1*, *Galns*, *Gns* und *Sulf1* sind im Linsen-Epithelium (le) exprimiert (A-D, G-J). *Gns* ist zusätzlich im Pigmentschicht-Epithelium (pe) der Retina exprimiert. *Ids* ist in der inneren neuroblastischen Schicht (ins) der Retina und *Sulf2* in der äußeren neuroblastischen Schicht (ans) der Retina exprimiert. Abkürzungen: Augenlid (al), Cornea (co), Gehirn (ge), Linse (li), neurale Retina (nr), optischer Nerv (on).

3.1.2. Sulfatasen im Knorpel und Knochen

Mit besonderem Interesse wurde die Gen-Expression der Sulfatasen im embryonalen Knorpel- und Knochengewebe (E14,5 und E16,5) an längs geschnittenen Vorderextremitäten untersucht. Am Tag E14,5 bestehen die Skelettelemente vorwiegend aus proliferierenden Chondrozyten und im zentralen Bereich aus hypertrophen Chondrozyten. Sie enthalten jedoch noch keinen mineralisierten

Knochen. Bei diesem Entwicklungsstadium konnten im Ellbogengelenk überlappende Expressionsdomänen von *ArsJ*, *Sulf1* und *Sulf2* identifiziert werden. Benachbart davon wird *ArsI* in der äußeren Schicht der proliferierenden Chondrozyten exprimiert. Als weitere Expressionsdomänen konnten für *ArsI* die hypertrophen Chondrozyten und für *Sulf2* die proliferierenden Chondrozyten identifiziert werden.

Zum Zeitpunkt E16,5 ist die endochondrale Ossifikation weiter fortgeschritten, erkennbar am mineralisierten Knochen im zentralen Teil der Skelettelemente. Zu diesem Stadium zeigen *ArsB* und *Gns* ein punktförmiges Expressionsmuster, welches typisch für Osteoklasten ist (Abb. 3.1.5G,J), und *Sulf1* und *Sulf2* sind diffus im Knochengewebe exprimiert (Abb. 3.1.5K,L). Außerdem sind *ArsI* und *Sulf1* in hypertrophen Chondrozyten und *Sulf2* in den distalen proliferierenden Chondrozyten exprimiert (Abb. 3.1.5H,K,L). *ArsJ* ist zum Zeitpunkt E16,5 nicht mehr nachweisbar.

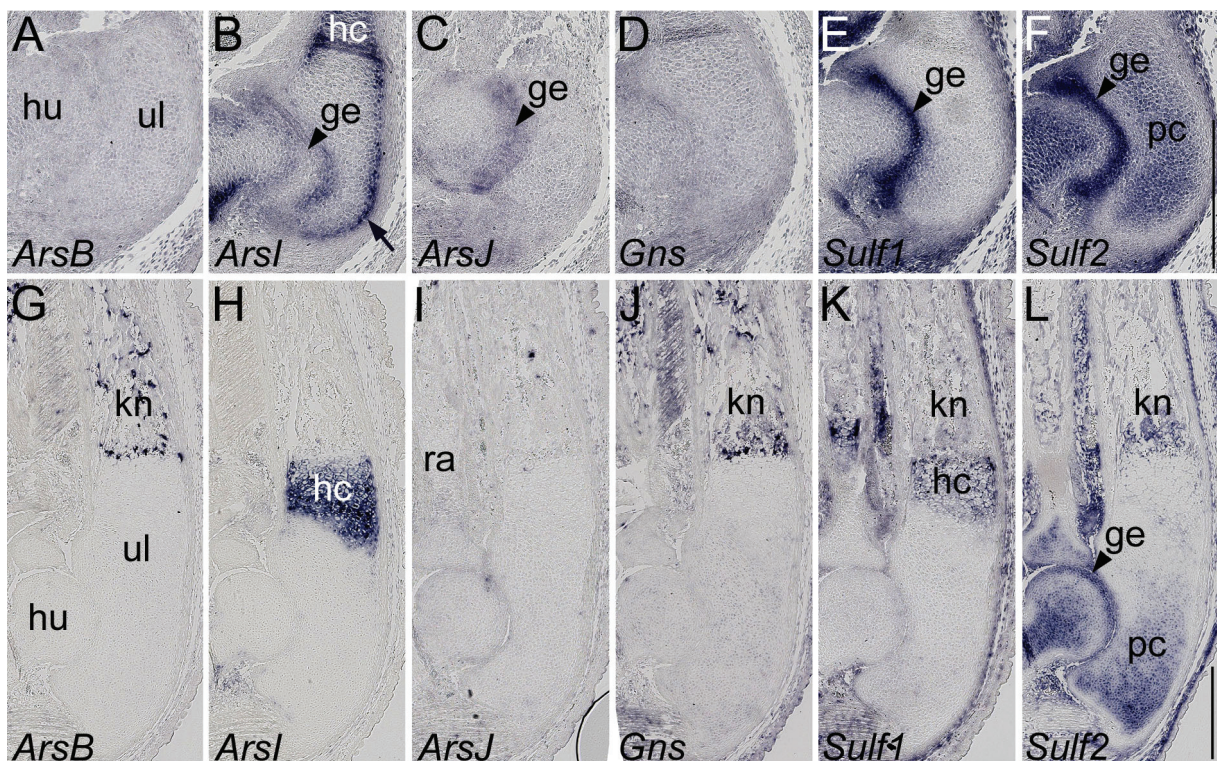


Abb. 3.1.5: Expression von Sulfatasen im embryonalen Knorpel und Knochen.

Längsschnitt durch das Ellbogengelenk zum Zeitpunkt E14,5 (obere Reihe) und E16,5 (untere Reihe). Die Gelenkregion (ge) zwischen Humerus (hu), Ulna (ul) und Radius (ra) exprimiert am Tag E14,5 *ArsJ*, *Sulf1* und *Sulf2*, und am Tag E16,5 nur noch *Sulf2* (C,E,F,L). *ArsI* ist nicht direkt im Gelenkspalt, sondern in benachbarten Chondrozyten, sowie in der äußeren Schicht der proliferierenden Chondrozyten (Pfeil in B) exprimiert. Abgegrenzt von dieser äußeren Chondrozytenschicht, wird *Sulf2* von proliferierenden Chondrozyten (pc) exprimiert (F,L). Die hypertrophen Chondrozyten (hc) exprimieren *ArsI* und *Sulf1* (B,H,K). Am Tag E16,5 wird im Knochen (kn) *ArsB* und *Gns* punktförmig und *Sulf1* und *Sulf2* diffus exprimiert (G,J,K,L). Die Maßstabsbalken in (F,L) entsprechen 400 µm und gelten für (A-F) bzw. für (G-L).

Die Expressionsdomänen der drei im Knorpel stark exprimierten Sulfatasen *ArsI* (unbekannte Sulfatase), *Sulf1* und *Sulf2* (beides HS-6-O-Endosulfatasen) wurden mit einer zweifarbigen *in situ*-Hybridisierung, bei der *Indian Hedgehog* (*Ihh*) als Referenzgen für prähypertrophen Chondrozyten diente, genauer bestimmt (Abb. 3.1.6). Dabei zeigte es sich, dass die Expressionsdomänen von *Ihh* und *ArsI* teilweise in Radius und Ulna jedoch nicht in den Phalangen überlappen (Abb. 3.1.6C,H). Im Unterschied dazu sind *Sulf1* und *Sulf2* weder in den Phalangen noch in Radius und Ulna mit *Ihh* überlappend exprimiert (Abb. 3.1.6I,J).

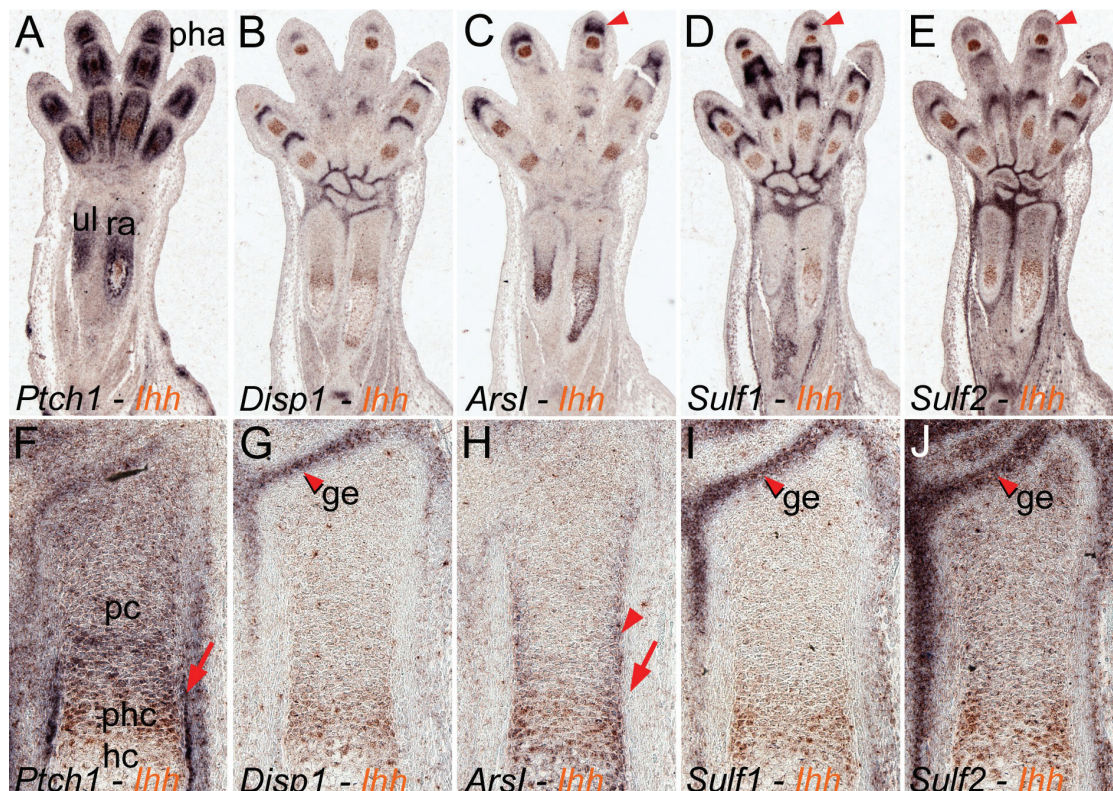


Abb. 3.1.6: Doppel-Färbung von *Ihh* mit *Ptch1*, *Disp1*, *ArsI*, *Sulf1* und *Sulf2*.

Für die zweifarbige *in situ*-Hybridisierung an E14,5 Vorderextremitäten (obere Reihe) und der vierfachen Vergrößerung des distalen Radius (untere Reihe) wurde *Ihh* (orange Färbung) als Referenzgen für die prähypertrophen Chondrozyten (phc) verwendet. (A,F) *Ptch1* ist in einer stärkeren Expressionsdomäne teilweise überlappend bzw. benachbart von *Ihh* und in einer schwächeren Domäne in den distal (im Bild oberhalb) gelegenen proliferierenden Chondrozyten (pc) exprimiert. (B,G) *Disp1* ist in den Gelenken (ge) exprimiert. (C,H) Die *ArsI*- und *Ihh*-Expressionsdomänen überlappen teilweise im Radius (ra) und Ulna (ul), jedoch nicht in den Phalangen (pha). (D,I) *Sulf1* ist nicht überlappend mit *Ihh* exprimiert. (E,J) *Sulf2* ist in proliferierenden Chondrozyten benachbart zu *Ihh* exprimiert. (C-E) Die distalen Phalangen exprimieren *ArsI*, *Sulf1* und *Sulf2* (siehe Pfeilspitzen). Die Maßstabsbalken in (E) 400 µm und (J) 100 µm gelten für (A-E) bzw. für (F-J).

Zusätzlich wurden *Dispatched 1* (*Disp1*) und *Patched 1* (*Ptch1*), zwei Gene die am Hedgehog-Signalweg beteiligt sind, auf Parallelschnitten hybridisiert. Dabei konnte sowohl für *Sulf1* als auch für *Sulf2* eine mit *Disp1* überlappende Expression im

Gelenkspalt nachgewiesen werden (Pfeilspitze in Abb. 3.1.6G,I,J). *Ars1* zeigt eine weitere Expressionsdomäne in der äußeren Schicht der proliferierenden Chondrozyten (Pfeilspitze in Abb.3.1.6H). Jedoch ist *Ars1* im Unterschied zu *Ptch1* nicht im Perichondrium exprimiert (roter Pfeil in Abb. 3.1.6F,H).

3.1.3. Expression von *Ars1*, *Sulf1* und *Sulf2* im Embryo

Mittels *whole mount in situ*-Hybridisierung wurden die Expressionsmuster von *Ars1*, *Sulf1* und *Sulf2* an intakten Embryonen der Entwicklungsstadien E9,5 bis E14,5 analysiert (Methodenteil 2.3.3.). Mit dieser Methode lassen sich besonders gut die zeitlichen und räumlichen Veränderungen der Genexpressionsmuster während der Embryonalentwicklung im Überblick darstellen.

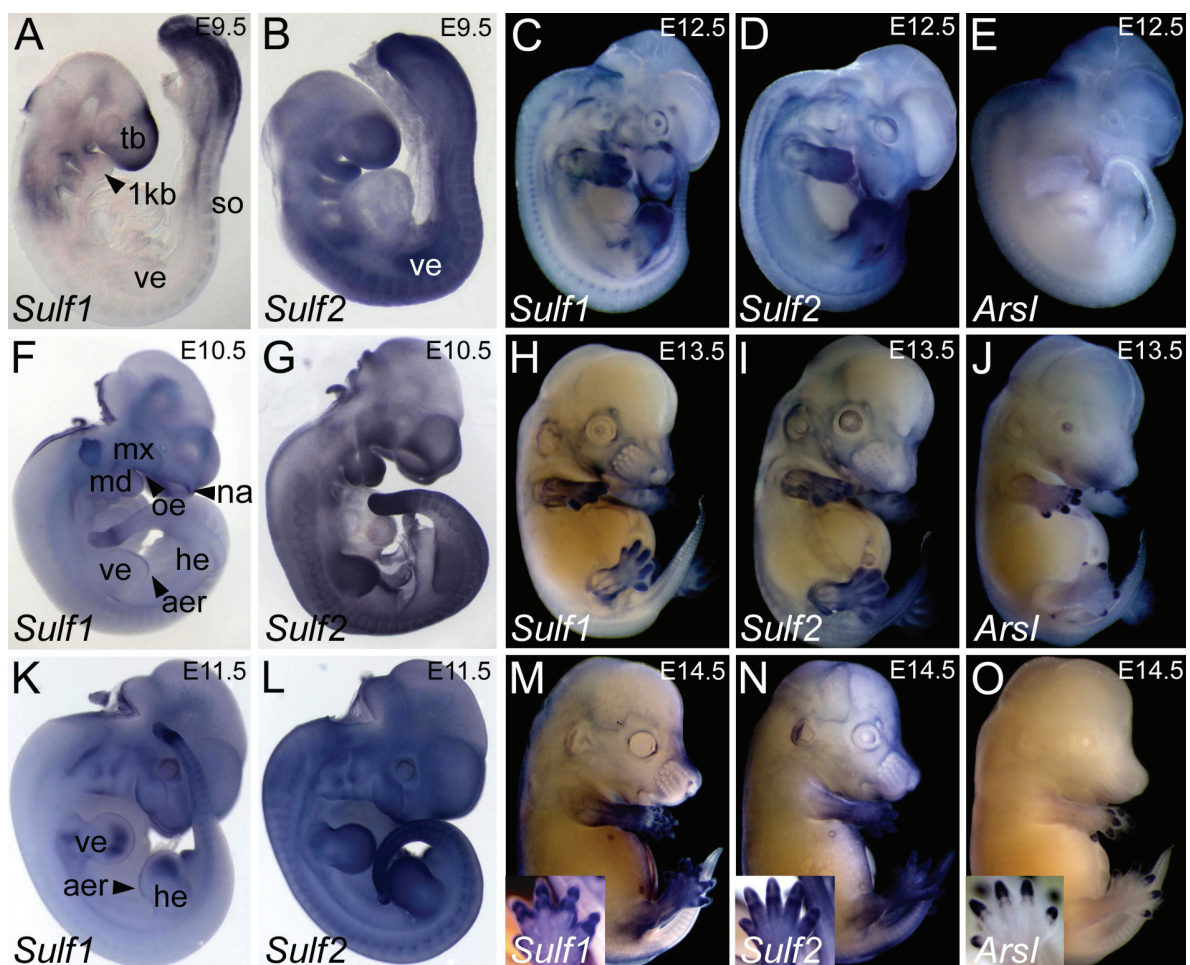


Abb. 3.1.7: *Ars1*-, *Sulf1*- und *Sulf2*-Expression bei E9,5 bis E14,5 Embryonen.

Die einzelnen Expressionsmuster sind im Text beschrieben. Abkürzungen: *apical ectodermal ridge* (aer), erster Kiemenbogen (1kb), Vorderextremität (ve), Hinterextremität (he), Mandibel-Anlage (md), Maxilla-Anlage (mx), Nasen-Anlage (na), orales Ektoderm (oe), Telencephalonbläschen (tb).

Für *Sulf1* und *Sulf2* wurde ein dynamisches Expressionsmuster beginnend beim jüngsten untersuchten Stadium E9,5 detektiert (Abb. 3.1.7). Dabei wurde in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten (Ohto et al., 2002; Nagamine et al.,

2005; Holst et al., 2007; Lum et al., 2007) eine weit verbreitete und teilweise überlappende Expression beider Sulfatasen im Vesikelepithel des Telencephalons, in den Nasenplakoden, den Somiten, der Schwanzspitze (Abb. 3.1.7) und der Bodenplatte (*floorplate*) des Rückenmarks (Abb. 3.1.8F,I) nachgewiesen. Interessanterweise konnte die *Ars1* bei den Stadien E9,5 bis E12,5 nicht detektiert werden. Diese Sulfatase ist jedoch ab dem Entwicklungsstadium E13,5 überlappend mit *Sulf1* und *Sulf2* in den distalen Phalangen exprimiert (Abb. 3.1.7H-J und Vergrößerung in M-O). Diese Co-Expression konnte ebenfalls an Gewebeschnitten von E14,5 Vorderextremitäten bestätigt werden (Abb. 3.1.6C-E).

3.1.4. Expression von *Sulf1* und *Sulf2* im embryonalen Skelett

Im Verlauf dieser Arbeit wurden Skelettveränderungen von *Sulf1* und *Sulf2* Mausmutanten näher untersucht (Kapitel 3.3.). Um die beobachteten Phänotypen besser verstehen zu können wurde die Expression dieser Sulfatasen an auswachsendem Kiemenbogen- und den Extremitäten-Anlagen (Abb. 3.1.8), sowie während der endochondralen Ossifikation (Abb. 3.1.9.) vertiefend untersucht.

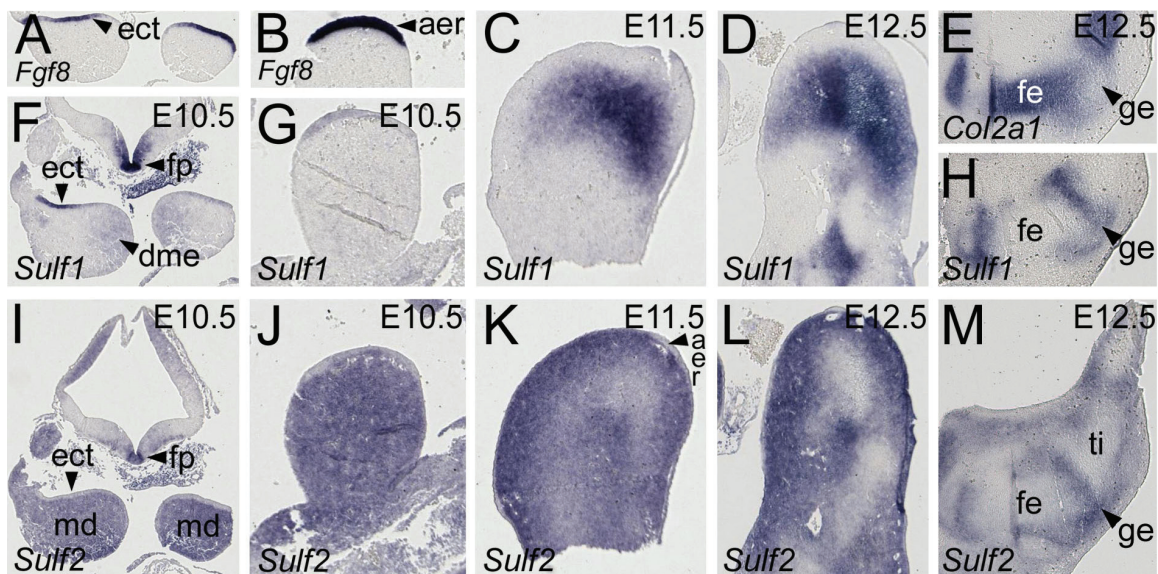


Abb. 3.1.8: *Sulf1* und *Sulf2* sind teilweise überlappend in den Kieferbogen- und Bein-Anlagen exprimiert.

Die einzelnen Expressionsmuster sind im Text beschrieben. Abkürzung: *apical ectodermal ridge* (aer), Ektoderm (ect), distales Mesenchym (dme), Femur (fe) floor plate (fp), Gelenk (ge), Mandibel-Anlage (md), Tibia (ti).

Der erste Kiemenbogen, aus dem sich während der embryonalen Entwicklung Ober- und Unterkiefer (Maxille und Mandibel) entwickeln, exprimiert *Sulf1* am Tag E9,5 im rostralen Oberflächenektoderm (Abb. 3.1.7A), sowie am Tag E10,5 im oralen Ektoderm (Abb. 3.1.7F) und im distalen Mesenchym (Abb. 3.1.8F). In den Extremitätenanlagen ist *Sulf1* zum Zeitpunkt E10,5 und E11,5 in der apikalen

Ektodermleiste (*apical ectodermal ridge*, AER) exprimiert (Abb. 3.1.8G,C). Die Identität des ersten Kiemenbogen-Ektoderms und der AER wurde durch Hybridisierung mit einer antisense-RNA-Sonde des *Fibroblast growth factor 8* (*Fgf8*), welcher spezifisch in diesen Strukturen exprimiert ist, bestätigt (Abb. 3.1.8A,B). Am Tag E11,5 und E12,5 ist *Sulf1* im distalen Mesenchym der Gliedmaßenanlagen exprimiert (Abb. 3.1.8C,D). Im benachbarten proximalen Mesenchym oder den Anlagen des Femurs ist *Sulf1* jedoch nicht exprimiert (Abb. 3.1.8H).

Im Gegensatz zu *Sulf1* wird *Sulf2* am Tag E10,5 nicht im Ektoderm, sondern im angrenzenden Mesoderm exprimiert (Abb. 3.1.8I,J). Regionale Unterschiede in der zuvor gleichmäßigen, mesodermalen *Sulf2*-Expression sind am Tag E11,5 und E12,5 erkennbar (Abb. 3.1.8K,L,M). Die Bereiche mit einer verminderten *Sulf2*-Expression, lassen sich mithilfe der Kollagen Typ II (*Col2a1*) Expression (Abb. 3.1.8E), als kondensierendes Mesenchym der Skelettanlage charakterisieren.

In den Bereichen der zukünftigen synovialen Gelenke sind *Sulf1* und *Sulf2* bei den Stadien E12,5 und E14,5 co-exprimiert (Abb. 3.1.8H,M; Abb. 3.1.9A,B). Außerdem sind beide Sulfatasen in den *Synchondroses sternales* (aus hyalinen Knorpel bestehende unechte Gelenke) zwischen den Sternebrae des Brustbeins (Sternum) und den Sternum-Rippen-Gelenken (sternocostal) co-exprimiert (Abb. 3.1.9E,F).

Zum Zeitpunkt E16,5 ist die *Sulf1*-Expression in den meisten Gelenken, ausgenommen in denen der Phalangen, herunter reguliert, während *Sulf2* weiterhin in allen untersuchten Gelenken exprimiert wird (Abb. 3.1.9C,D,G,H). Obwohl *Sulf2* in den frühen mesenchymalen Kondensationen (E12,5) nicht exprimiert wird, ist diese Sulfatase in den proliferierenden Chondrozyten (ab E13,5) wieder verstärkt exprimiert (Abb. 3.1.9B,D und Daten nicht gezeigt). In den hypertrophen Chondrozyten wird *Sulf1* zum Zeitpunkt E14,5 und E16,5 exprimiert (Abb. 3.1.9A,C). Eine schwache Expression von *Sulf1* und *Sulf2* konnte zum Zeitpunkt E16,5 auch im Knochen detektiert werden (Abb. 3.1.9C,D,K,L). Bei genauerer Betrachtung erkennt man, dass *Sulf1* und *Sulf2* außerhalb des Perichondriums, im benachbarten Bindegewebe co-exprimiert sind (Vergrößerung in Abb. 3.1.9C,D).

In den Zahnanlagen am Tag E14,5 wird *Sulf1* im Ektoderm und *Sulf2* im angrenzenden Mesenchym exprimiert (Abb. 3.1.9I,J). Zum Zeitpunkt E16,5 findet sich *Sulf1*-Expression in den Ameloblasten und *Sulf2* in der Zahnpulpa (Abb. 3.1.9K,L). Des Weiteren wird *Sulf1* am Tag E14,5 in Zellen, welche die *Sternalen Bänder* (Vorläufergewebe des Brustbeins) umgeben, exprimiert (Abb. 3.1.9E). Zum

gleichen Zeitpunkt konnte eine weitere *Sulf2*-Expressionsdomäne in den Sehnen von längs geschnittenen Extremitäten detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

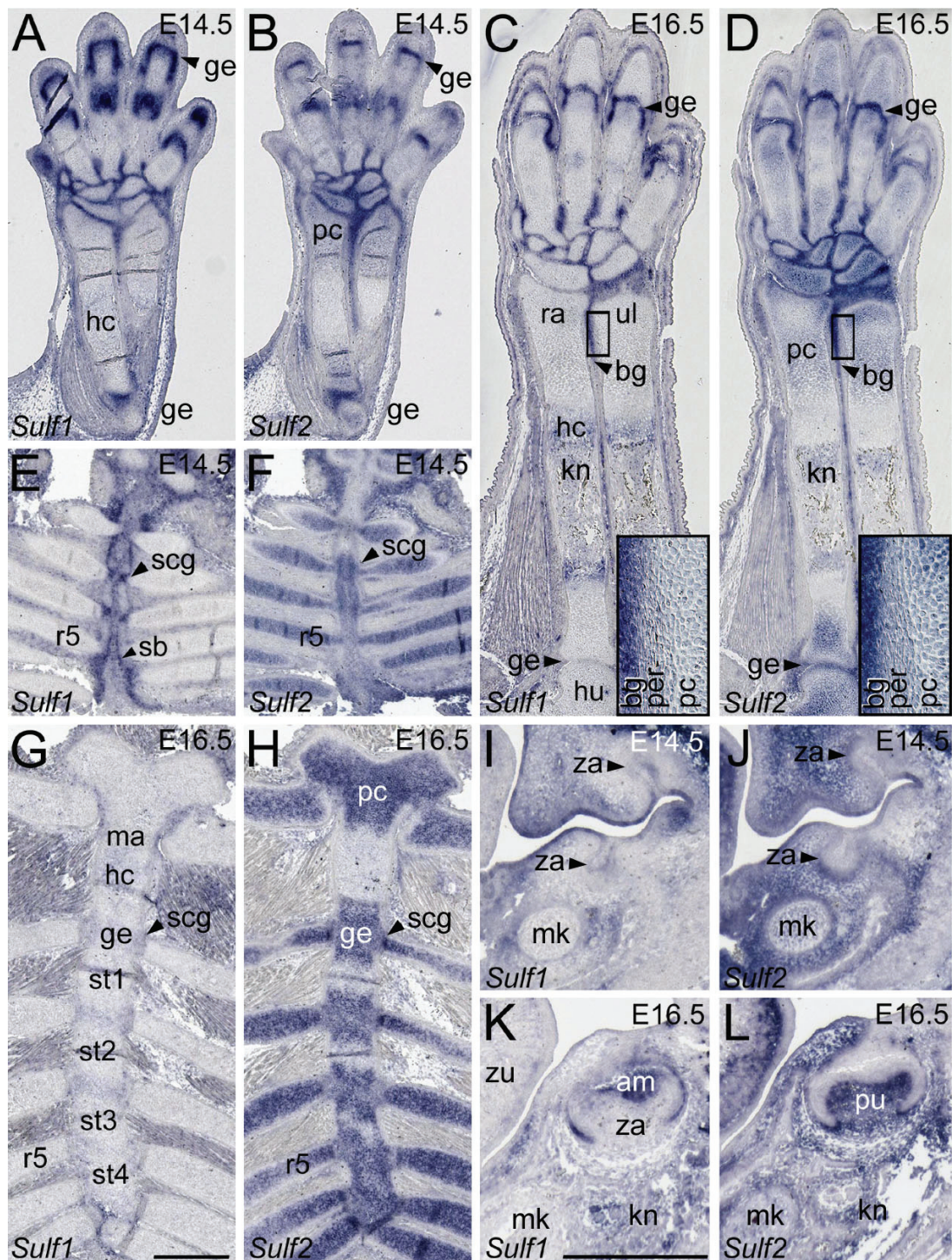


Abb. 3.1.9: Detaillierte Expressionsanalyse von *Sulf1* und *Sulf2* im Knorpel.

Die Expressionsdomänen der E14,5 (A,B,E,F,I,J) und E16,5 (C,D,G,H,K,L) Vorderextremitäten (A-D), des Sternums mit ansetzenden Rippen (E-H) und der Zahnanlagen (I-L) sind im Text näher beschrieben. Maßstabsbalken in (G) 500 µm gilt für (A-H) und in (K) 500 µm gilt für (I-L). Abkürzungen: Ameloblast (am), Knochen (kn), Bindegewebe (bg), Gelenk (ge), hypertrophe Chondrozyten (hc), Humerus (hu), Meckelscher Knorpel (mk), Manubrium (ma), Perichondrium (per), proliferierende Chondrozyten (pc), prähypertrophe Chondrozyten (phc), Zahnpulpa (pu), Radius (ra), Rippe (r1 - r7), Sternales Band (sb), Sternebrae (st1 - st4), sternocostales Gelenk (scg), Ulna (ul), Zahn-Anlage (za), Zunge (zu).

3.2. Die Sulf1- und Sulf2-Genetrap Mausmutanten

Um die Funktion der im Knorpel exprimierten Sulfatasen Arsl, Sulf1 und Sulf2 während der Knorpel- und Knochenentwicklung *in vivo* untersuchen zu können, sind knock-out Mausmodelle am besten geeignet. Zu Beginn dieser Arbeit standen keine Mausmutanten dieser Sulfatasen zur Verfügung. Es gab jedoch zumindest für Sulf1 und Sulf2 embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Maus, die durch Genetrap-Mutagenese gentechnisch verändert waren (BayGenomics Consortium, San Francisco, Stryke et al., 2003). Ausgehend von diesen ES-Zelllinien wurden von Dr. Markus Moser (MPI für Biochemie, München) chimäre Mäuse generiert (Methodenteil 2.4.1.). Die daraus resultierenden Mausstämme Sulf1^{gt} bzw. Sulf2^{gt} werden in der vorliegenden Arbeit erstmals charakterisiert.

3.2.1. Lokalisation der Genetrap Integration im Genom

Anhand der 5'- RACE (*rapid amplification of cDNA ends*)-Sequenzinformation aus der BayGenomics Datenbank konnte die Genetrap-Vektor Insertionsstelle für das Sulf1-Gen im Intron 1 und für das Sulf2-Gen im Intron 3 ermittelt werden (Abb. 3.2.1). Anschließend wurde der Genetrap-flankierende gDNA-Abschnitt mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden Vorwärtsprimer die alle 3 - 4 kb im jeweiligen Intron positioniert waren und Genetrap-spezifische Rückwärtsprimer verwendet (Methodenteil 2.4.2.).

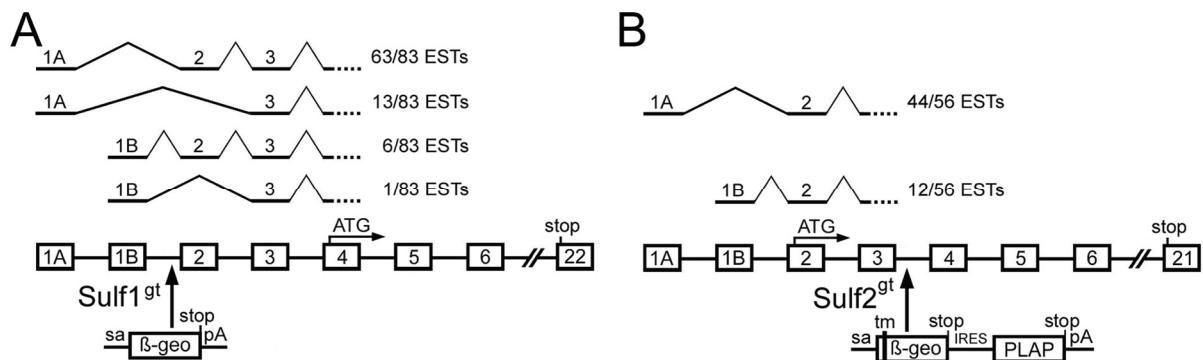


Abb. 3.2.1: Alternative Spleiß-Formen, Genstruktur und Lage der Genetrap-Insertion im Sulf1- und Sulf2-Gen.

Schematische Darstellung der Exons 1A bis 6 sowie dem letzten Exon von Sulf1 (**A**) und Sulf2 (**B**) mit eingezeichnetem Translationsstartcodon (ATG) und Stopcodon (stop). Darüber sind alternative mRNA-Spleißvarianten und ihre Häufigkeiten in der NCBI EST-Datenbank dargestellt. Die Integrationsstelle des Genetrap-Vektors (β-Geo) ist durch einen Pfeil unterhalb der Exon-Intron-Struktur angegeben. Der Spleiß-Akzeptor (sa) im 5'-Ende des Genetrap-Vektors bewirkt die Bildung einer Hybrid-RNA bestehend aus den *upstream* gelegenen Sulfatase-Exons und dem β-Geo-Exons. Das Polyadenylierungssignal (pA) am 3'-Ende des β-Geo-Exons verhindert die Transkription von *downstream* gelegenen Sulfatase-Exons.

Durch Sequenzierung der PCR-Produkte und Vergleich mit der NCBI-Genomsequenz der Maus konnten die Genetrap-Integrationsstellen ermittelt werden. Diese liegt beim Sulf1 Genetrap 4105 bp *upstream* vom Exon 2 und beim Sulf2 Genetrap 1117 bp *downstream* vom Exon 3 (DNA-Sequenzen im Anhang 8.4.1. und 8.4.2.). Die Sulf1^{gt} und Sulf2^{gt} Tiere wurden mit einer PCR, welche die genomische Integrationsstelle überspannt, genotypisiert.

3.2.2. Reporter-Expression bei Sulf1^{gt} und Sulf2^{gt} Embryonen

Wie in Abschnitt 2.4.1. näher erläutert, führt die Integration der Genetrap-Vektoren im Intronbereich der Sulfatasen, zur Transkription einer Hybrid-RNA bestehend aus den *upstream* gelegenen Exons der Sulfatase, gefolgt vom β -Geo-Reporter-Gen des Genetrap Vektors. Da diese Hybrid-RNA vom endogenen Sulf1- bzw. Sulf2-Promotor exprimiert wird, sollte der enzymatische Nachweis der, im β -Geo Reporter-Gen kodierten, β -Galaktosidase Aktivität das Expressionsmuster der jeweiligen Sulfatase widerspiegeln.

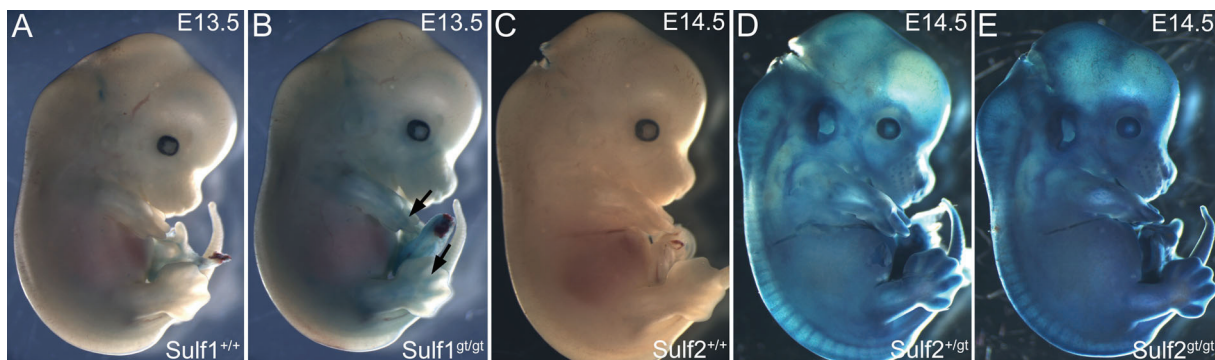


Abb. 3.2.2: Die β -Galaktosidase Färbung der Genetrap Mutanten entspricht dem Sulf1 bzw. Sulf2 Expressionsmuster.

Die blaue Färbung (X-Gal) entsteht durch die β -Galaktosidase Aktivität des in diesen Geweben exprimierten Genetrap-Reporter-Genes (β -Geo). **(A,B)** Beim Sulf1- β -Geo Genetrap ist nach zweitägiger Inkubation eine schwache Färbung im E13,5 Sulf1^{gt/gt} Embryo (Pfeile in B) aber nicht im Wildtyp-Embryo (A) erkennbar. **(C-E)** Beim Sulf2- β -Geo Genetrap ist bereits nach wenigen Stunden eine starke Färbung in E14,5 Sulf2^{+/gt} (D) und Sulf2^{gt/gt} (E) Embryonen aber nicht im Wildtyp-Embryo (C) erkennbar. Da homozygote Genetrap Tiere β -Galaktosidase von zwei Allelen exprimieren, sind diese intensiver gefärbt als die heterozygoten Tiere (D,E).

Tatsächlich konnte nach Inkubation mit dem β -Galaktosidase-Farbsubstrat (X-Gal) ein spezifisches Färbemuster bei Sulf1^{gt} und Sulf2^{gt} Embryonen, jedoch nicht bei Wildtyp-Embryonen (^{+/+}), detektiert werden. Bei Sulf1^{gt/gt} Mutanten konnte erst nach Verlängerung der Inkubationszeit auf zwei Tage eine schwache Färbung in den Gelenken der Finger detektiert werden (Pfeile in Abb. 3.2.2B). Dieses Muster stimmt mit der Sulf1-mRNA-Expression, welche bei der *in situ*-Hybridisierung von ganzen

Embryonen ermittelt wurde, überein (Abb. 3.1.7M). Die β -Galaktosidase-Aktivität der *Sulf2^{gt}* Mutanten war bereits nach wenigen Stunden als kräftige Färbung erkennbar (Abb. 3.2.2D,E). Die Färbung entsprach dem mittels *in situ*-Hybridisierung detektierten *Sulf2*-Expressions-musters (Abb. 3.1.7N). Beispielsweise war eine Färbung in den Gelenken der Phalangen, den Tasthaarwurzeln der Schnauze und bei älteren Embryonen eine verstärkte Färbung in der Haut erkennbar (Abb. 3.2.2D,E).

Eine mögliche Erklärung für die schwache β -Galaktosidasefärbung der *Sulf1^{gt}* Mutanten liegt in der Integrationsstelle des Genetrap-Vektors in der 5'UTR-Region des *Sulf1*-Genes. Infolgedessen enthält die *Sulf1*- β -Geo Hybrid-RNA nicht das endogene *Sulf1* Startcodon, welches im *downstream* gelegenen Exon 4 lokalisiert ist (Abb. 3.2.1A). Stattdessen scheint ein weniger effizientes alternatives ATG-Codon als Translationsstart für die β -Galaktosidase zu dienen.

3.2.3. *Sulf1^{gt}* und *Sulf2^{gt}* sind hypomorphe Allele

Um zu prüfen, ob die Insertion der Genetrap-Vektoren tatsächlich zur Inaktivierung der Sulfatase-Allele führt, wurden die Sulfatase-Transkripte mittels *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen. Dazu wurden Gewebeschnitte von Wildtyp-Tieren und homozygoten Genetrap-Mutanten mit antisense-RNA-Sonden für den 3'UTR Bereich von *Sulf1* bzw. *Sulf2* hybridisiert.

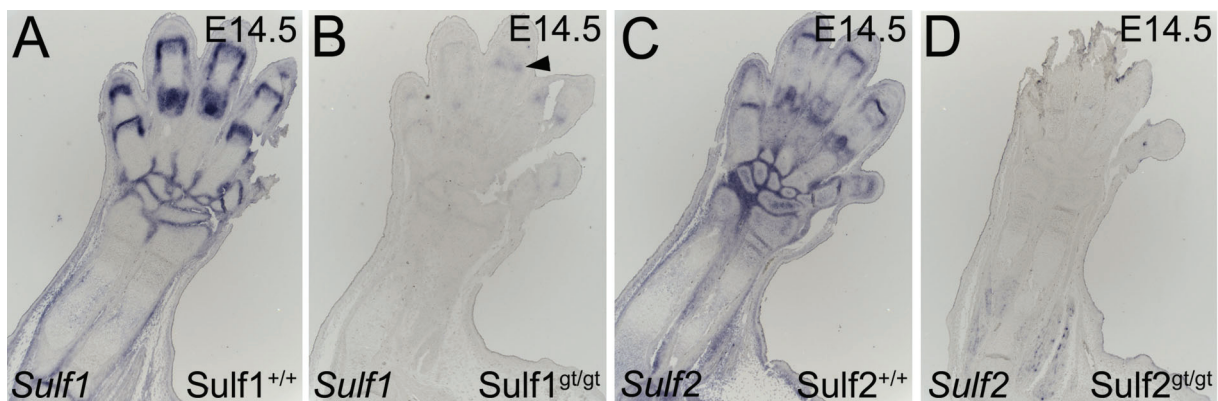


Abb. 3.2.3: Stark verminderte *Sulf1*- und *Sulf2*-Expression in Genetrap-Tieren.

(A,B) Die ISH mit einer antisense-*Sulf1*-Sonde (3'UTR) zeigt eine stark reduzierte Expression (siehe Pfeilspitze) von *Sulf1* in der Vorderextremität eines E14,5 *Sulf1^{gt/gt}* Tieres (B) im Vergleich zum Wildtyp-Wurfgeschwister (A). (C,D) Bei der ISH mit der antisense-*Sulf2*-Sonde (3'UTR) konnte keine Expression von *Sulf2* in der E14,5 *Sulf2^{gt/gt}* Vorderextremität detektiert werden (D). Die gleichzeitig durchgeführte ISH an einem Wildtyp-Wurfgeschwister zeigt eine normale *Sulf2*-Expression (C).

Theoretisch sollte das Polyadenylierungssignal des β -Geo-Exons die Transkription weiter *downstream* gelegener Sulfatase-Exons verhindern. Es konnte jedoch in

$Sulf1^{gt/gt}$ Mutanten mit der *Sulf1*-3'UTR-Sonde eine schwache Färbung in den Gelenken detektiert werden. Obwohl diese Färbung viel schwächer als bei $Sulf1^{+/+}$ Tieren ist, lässt sich daraus schlussfolgern, dass homozygote $Sulf1^{gt/gt}$ Mutanten eine Restmenge an Wildtyp-*Sulf1*-Transkript exprimieren (Pfeilspitze in Abb. 3.2.3A,B). Mit der *Sulf2*-3'UTR-Sonde ist in $Sulf2^{gt/gt}$ Mutanten kein *Sulf2*-Transkript detektierbar, während in Wildtyp-Geschwistertieren die *Sulf2*-Expression gut nachweisbar ist (Abb. 3.2.3C,D).

Da die *in situ*-Hybridisierung nicht geeignet ist geringe Transkriptmengen nachzuweisen, wurde mittels quantitativer RT-PCR die Reduktion der *Sulf1*- und *Sulf2*-Transkriptmenge in den Genetrap-Mutanten quantifiziert (Methodenteil 2.1.6.). Es wurden Wildtyp-Tiere ($^{+/+}$), heterozygote ($^{+/gt}$) und homozygote ($^{gt/gt}$) $Sulf1^{gt}$ bzw. $Sulf2^{gt}$ Einzelmутanten (Abb. 3.2.4A,B) und $Sulf1^{gt};Sulf2^{gt}$ Doppelmутanten (Abb. 3.2.4C,D) mit dieser Methode untersucht. Die verwendeten Primer befinden sich im kodierenden Bereich der Sulfatasen, *downstream* der Integrationsstelle der Genetrap-Vektoren, für *Sulf1* in den Exons 12/13 und für *Sulf2* in den Exons 11/12 (Methodenteil 2.1.6). Dies bedeutet, dass *Sulf*-Transkripte, die an das Genetrap-Exon gespleißt wurden, in der RT-PCR nicht amplifiziert werden können, da die Primer-bindenden Exons nicht enthalten sind. Dagegen sind Transkripte, die das Genetrap-Exon nicht enthalten in der RT-PCR nachweisbar.

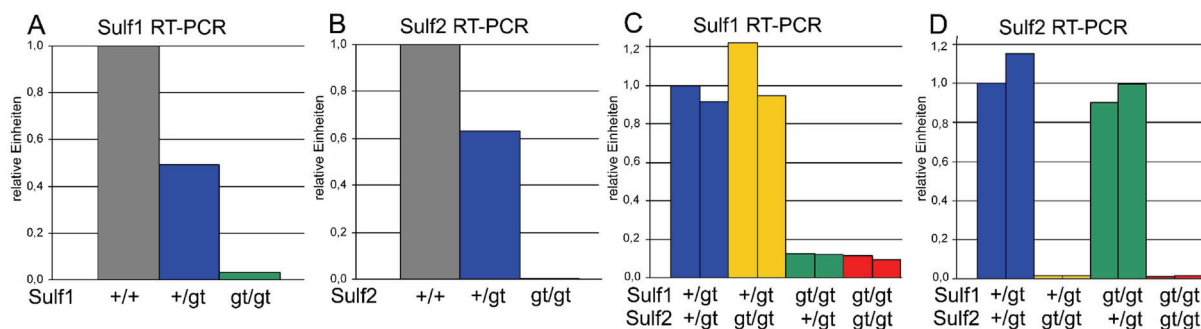


Abb. 3.2.4: Quantifizierung der *Sulf1*- bzw. *Sulf2*-Expression bei Mausmutanten. Das Expressionslevel der *Sulf1*-mRNA (A,B) und *Sulf2*-mRNA (C,D) wurde mittels quantitativer RT-PCR in E14,5 Extremitäten von Genetrap-Mutanten bestimmt, der jeweilige Genotyp ist unterhalb der x-Achse angegeben. In Einzelmутanten (A,B) und Doppelmутanten (C,D) sind geringe Mengen an *Sulf1* (3-12%) bzw. *Sulf2* (0,04-0,2%) mRNA nachweisbar, deshalb handelt es sich bei beiden Genetrap Mutanten um hypomorphe Allele. Dabei ist zu beachten, dass bei den Doppelmутanten (C,D) heterozygote Tiere (blaue Balken) als Referenz dienten und bei den Einzelmутanten Wildtyp-Tiere (graue Balken) verwendet wurden. Deshalb müssen beim Vergleich mit den Ergebnissen der homozygoten Einzelmутanten (A,B) die Werte der Doppelmутanten (C,D) ungefähr halbiert werden.

Für beide Genetrap-Mutanten konnten in homozygoten Tieren Genetrap-freie, normale Sulfatase-Transkripte nachgewiesen werden. Bezieht man die Messwerte

auf Wildtyp-Tiere lassen sich in $Sulf1^{gt/gt}$ Mutanten 3 - 6% der normalen $Sulf1$ -Transkripte und in $Sulf2^{gt/gt}$ Mutanten 0,04 - 0,1% der normalen $Sulf2$ -Transkripte nachweisen (Abb. 3.2.4). Durch weitere RT-PCRs, mit Primerpaaren, die das Genetrap enthaltene Intron überspannen, konnte die Präsenz geringer Mengen an Wildtyp-Transkripten in homozygoten Mutanten bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Der höhere Anteil an Wildtyp-Transkripten beim $Sulf1$ -Genetrap im Vergleich zum $Sulf2$ -Genetrap, könnte mit dem alternativen spleißen des zweiten $Sulf1$ -Exons erklärt werden. Da in dessen Nähe (4 kb) der $Sulf1$ -Genetrap-Vektor integriert ist, wird das β -Geo-Exon vermutlich ebenfalls alternativ gespleißt. Die in Abbildung 3.2.1 dargestellten, verschiedenen $Sulf1$ -Spleißvarianten im 5'UTR wurden anhand von EST-Sequenzen aus der NCBI-Datenbank identifiziert.

3.2.4. Sulfatasen und Sulfotransferasen in $Sulf1^{gt}$ und $Sulf2^{gt}$ Mutanten

Mittels quantitativer RT-PCR wurde die Transkriptmengen von vier Sulfatasen (*ArsB*, *ArsI*, *ArsJ*, *Gns*), welche im Knorpel bzw. Knochen exprimiert sind (Abschnitt 3.1.2.), und von drei Heparansulfat-6-O-Sulfotransferasen (*Hs6st1*, *Hs6st2*, *Hs6st3*) in $Sulf1^{gt};Sulf2^{gt}$ Doppelmutanten untersucht (Abb. 3.2.5).

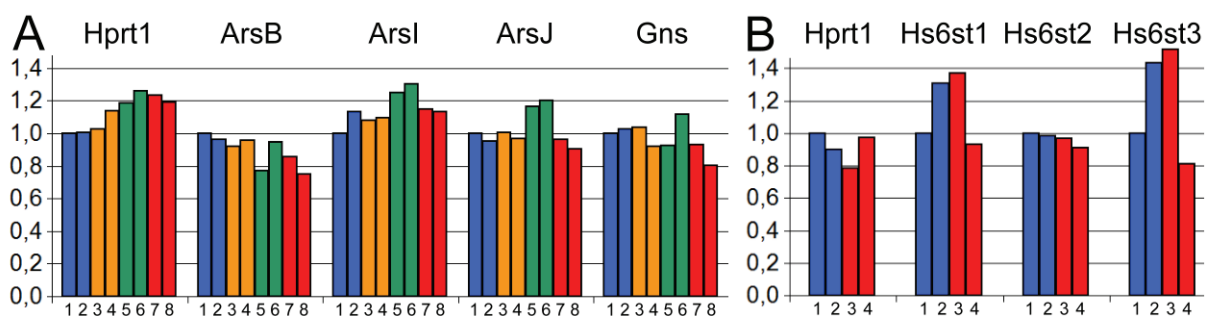


Abb. 3.2.5: Die $Sulf1^{gt}$ und $Sulf2^{gt}$ Mutationen beeinflussen nicht die Expression anderer Sulfatasen und 6-O-Sulfotransferasen.

Quantitative RT-PCR von **(A)** *Hprt1* und vier Sulfatasen *ArsB*, *ArsI*, *ArsJ*, *Gns* und **(B)** *Hprt1* und drei Sulfotransferasen *Hs6st1*, *Hs6st2*, *Hs6st3*. Abgesehen von den Schwankungen zwischen den einzelnen Embryonen, die auch beim Kontrollgen *Hprt1* erkennbar sind lässt sich kein Zusammenhang zwischen den Genotyp der unterschiedlichen $Sulf1^{gt};Sulf2^{gt}$ Mutanten und den Schwankungen der Kandidatengen-Expression erkennen. Die verwendete RNA wurde isoliert bei (A) aus den Extremitäten von E14,5 Embryonen mit den Genotypen $Sulf1^{+/gt};Sulf2^{+/gt}$ (blau, 1+2), $Sulf1^{+/gt};Sulf2^{gt/gt}$ (gelb, 3+4), $Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{+/gt}$ (grün, 5+6), $Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt}$ (rot, 7+8) und bei (B) aus E12,5 ganzen Embryonen mit den Genotypen $Sulf1^{+/gt};Sulf2^{+/gt}$ (blau, 1+2) und $Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt}$ (rot, 3+4). Zur Normalisierung der cDNA-Menge der einzelnen Tiere wurden die Expression von Gapdh verwendet (Methodenteil 2.1.6.).

Die in Abbildung 3.2.5 erkennbaren Schwankungen zwischen den einzelnen Tieren, treten sowohl bei den untersuchten Kandidaten-Genen, als auch beim verwendeten Kontrollgen (*Hprt1*) auf. Es ist keine Korrelation zwischen den Genotypen der

einzelnen Embryonen und der Expressionsstärke der untersuchten Gene zu erkennen. Selbst bei doppelt homozygoten Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Mutanten (rote Balken) konnte keine Veränderung festgestellt werden.

3.2.5. Das Sulf2 Protein ist in Sulf2^{gt/gt} Mutanten nicht detektierbar

Zusätzlich zum Nachweis der reduzierten Transkriptmenge mittels *in situ*-Hybridisierung und quantitativer RT-PCR sollte eine Reduktion der Sulfatase-Menge auch auf Proteinebene mittels SDS-PAGE und Western-blot nachgewiesen werden. Dazu wurden Peptid-Antikörper im Kaninchen von der Firma Eurogentec hergestellt (Methodenteil 2.1.8.). Die Affinitätsgereinigten Sulfatase-Antikörper (Anti-Sulf1-103 und Anti-Sulf2-106) wurden zunächst an rekombinant hergestelltem Sulf1- bzw. Sulf2-Protein getestet und danach mit Proteinextrakten von E14,5 Genetrap Maus-Mutanten verifiziert.

Zur Kontrolle der Proteinexpression wurden Sulfatasen mit einem C-terminalen V5-His-Tag exprimiert, welcher durch den Anti-V5-Antikörper nachweisbar ist. Im Western-blot wurde ein Molekulargewicht der in CHO-Zellen exprimierten und mit einem C-terminalen V5-His-Tag versehenen Sulfatasen auf 124 kDa (Sulf1-V5-His) bzw. 126 kDa (Sulf2-V5-His) ermittelt (Abb. 3.2.6A). Anhand der Aminosäuresequenz wurde mit der Software Editseq (DNASTar) ein Molekulargewicht von jeweils 104 kDa für beide Proteine Sulf1-V5-His und Sulf2-V5-His berechnet. Der 27 Aminosäure umfassende V5-His-Tag wurde dabei mit 3 kDa berechnet. Die Differenz von ca. 20 kDa aus der experimentell ermittelten Größe (124-126 kDa) und der berechneten Größe (104 kDa) ist sehr wahrscheinlich auf eine mehrfache N-Glykosylierung der Sulfatasen zurückzuführen, wie es für QSulf1 in einer aktuellen Studie nachgewiesen wurde (Ambasta et al., 2007).

In einem ersten Test wurden Zelllysate von CHO-Zelllinien verwendet, welche die Sulf1-V5-His bzw. Sulf2-V5-His Expressionskonstrukte stabil exprimieren (Diplomarbeit von Jana Göttert). Beide Sulfatasen können mit dem Anti-V5-Antikörper detektiert werden. Mit dem Anti-Sulf1-103-Antikörper ist jedoch nur eine schwache Bande in diesem Bereich zu erkennen. Außerdem detektiert dieser Antikörper zahlreiche unspezifische Banden, die über die ganze Trennstrecke verteilt sind (Abb. 3.2.6A). Im Unterschied dazu erkennt der Anti-Sulf2-106-Antikörper spezifisch das überexprimierte 126 kDa Sulf2-V5-His-Protein und nicht das zur Kontrolle in der benachbarten Spur aufgetragene 124 kDa Sulf1-V5-His-Protein. Zusätzlich werden von diesem Antikörper weitere Proteine in allen Gelspuren

detektiert, besonders auffällig sind zwei Banden bei ~70 kDa die als Ladekontrolle verwendet werden können (Abb. 3.2.6A).

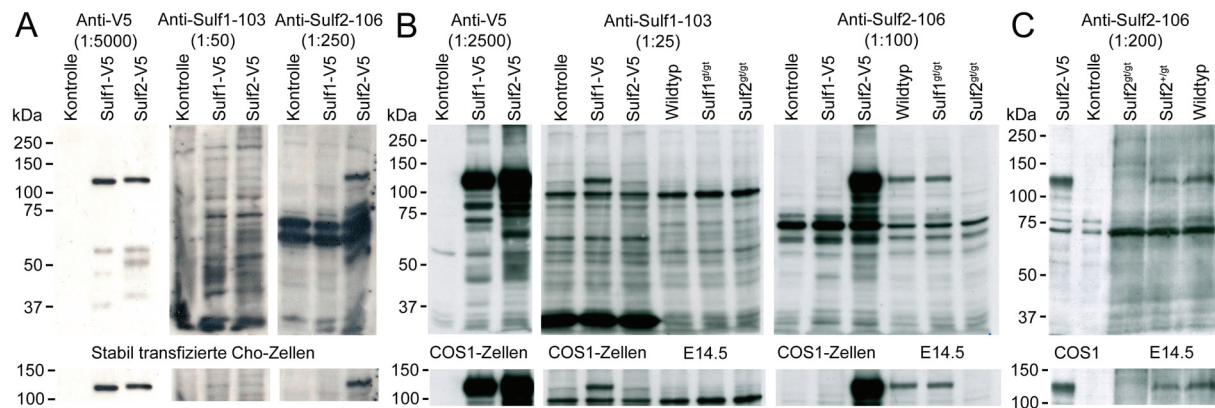


Abb. 3.2.6: Evaluation der Spezifität von Sulf1- und Sulf2-Peptid-Antikörpern.

Zur besseren Übersichtlichkeit ist der Bereich von 100-150 kDa der Sulf1 und Sulf2 zeigt unterhalb des gesamten Blots noch einmal dargestellt. **(A)** Zelllysate aus normalen CHO-Zellen (Kontrolle) und stabil transfizierten CHO-Zellen Linie Sulf1-A2-2 (Sulf1-V5) und Linie Sulf2-A5 (Sulf2-V5) wurden mit folgenden Primär-Antikörpern Anti-V5 (links), Anti-Sulf1-103 (Mitte) und Anti-Sulf2-106 (rechts) inkubiert, die Verdünnung ist in Klammern darunter angegeben. Der Anti-V5-Antikörper detektiert Sulf1 (124 kDa) und Sulf2 (126 kDa). Der Anti-Sulf1-103-Antikörper detektiert nur eine schwache Bande in der Sulf1-V5 Spur, während der Anti-Sulf2-106 eine klare Bande in der Sulf2-V5-Spur erkennt. **(B)** Bei großen Mengen an rekombinant hergestelltem Sulf1-Protein aus transient transfizierten COS1 Zellen (siehe Anti-V5 links), wird auch durch den Anti-Sulf1-103-Antikörper (Mitte) die 124 kDa Sulf1 Bande erkannt. Jedoch ist die Sensitivität dieses Serums für Proteinextrakte aus E14,5 Extremitäten zu gering, da keine Sulf1-Bande erkannt wurde. Der Anti-Sulf2-106-Antikörper (rechts) erkennt nicht nur die Sulf2-Bande im Sulf2-V5 COS1 Zelllysate sondern auch in Proteinextrakten aus E14,5 Extremitäten von Wildtyp-Tieren und Sulf1^{gt/gt} Mutanten, jedoch ist keine Bande bei Sulf2^{gt/gt} Mutanten zu erkennen. **(C)** In einem weiteren Blot wurde der Anti-Sulf2-106-Antikörper erneut getestet, es wurden 1/10 (2 µg pro Spur) des COS1-Zelllysate von Blot B geladen und 50 µg Extremitäten-Proteinextrakt von E14,5 Wurfgeschwistern geladen. Die Intensität der 126 kDa Sulf2 Bande ist bei Sulf2^{+/gt} Tieren geringer als beim Wildtyp-Tier und ist nicht mehr detektierbar bei der homozygoten Sulf2^{gt/gt} Mutante. Als Ladekontrolle diente die unspezifische ~70 kDa Bande, die keinen Unterschied zwischen den E14,5 Extrakten erkennen lässt. Detektionszeit Blot A (15 min), Blot B (2 min) und Blot C (20 min).

Um größere Mengen an Sulfatase zu Verfügung zu haben, wurden im nächsten Versuch COS1 Zellen transient mit Sulf1-V5-His bzw. Sulf2-V5-His Expressionsplasmiden transfiziert. Wie die Anti-V5-Färbung zeigt, wurden große Mengen Sulfatase auf das Gel geladen (Abb. 3.2.6B). Unter diesen Bedingungen ist auch mit dem Anti-Sulf1-103-Antikörper eine deutliche 124 kDa Sulf1-V5-His-Bande zu erkennen, nicht jedoch bei dem in der Nachbarspur aufgetragenem Sulf2-V5-His-Lysat. Jedoch ist die Intensität der Sulf1-Bande im Anti-Sulf1-103-Blot viel schwächer als im Anti-V5-Blot. Aufgrund dieser geringen Sensitivität ist der Anti-Sulf1-103-

Antikörper ungeeignet das Sulf1-Protein im Proteinextrakt von E14,5 Extremitäten zu detektieren (Abb. 3.2.6B). Somit kann mit diesem Antikörper keine Aussage über die Reduktion von Sulf1 auf Proteinebene in den Genetrap Mutanten getroffen werden (Abb. 3.2.6B).

Der Anti-Sulf2-106-Antikörper hingegen erkennt sowohl im COS1 Zellextrakt (Abb 3.2.6B) als auch im Proteinextrakten von E14,5 Wildtyp-Tieren eine Bande bei circa 126 kDa, die im heterozygoten Sulf2^{+/-} Tier schwächer ist und beim homozygoten Sulf2^{gt/gt} Tier ganz verschwindet (Abb 3.2.6C). Es könnten jedoch trotzdem geringe Mengen an Sulf2-Protein im Gewebelysat der Sulf2^{gt/gt} Tieren vorhanden sein, die aber unterhalb der Nachweisgrenze dieser Methode liegen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Sulf2 sowohl auf Transkriptionsebene als auch auf Proteinebene in Sulf2^{gt/gt} Mutanten sehr stark reduziert ist.

3.3. Skelettphänotyp der Sulf1 und Sulf2 Mausmutanten

Die präparierten und gefärbten Skelette (Methodenteil 2.2.5.) von homozygoten Sulf1^{gt/gt} bzw. Sulf2^{gt/gt} Einzelmутanten zeigten jeweils eine eher unauffällige Veränderung. So wiesen 71% (5/7) der adulten Sulf1^{gt/gt} Skelette ein bis zwei dorsal unvollständig geschlossene Wirbelbögen auf. Bei den Wildtyp-Skeletten trat dies nur bei 22% (2/9) der untersuchten Exemplare auf. Bei den Sulf2^{gt/gt} Skeletten wurde eine beschleunigte Verknöcherung im Bereich der Lendenwirbel bei 42% (3/7) der E18,5 Skelette im Vergleich zu Wildtyp-Tieren vorgefunden (Tab. 3.3.3 und 3.3.4; Abschnitt 3.3.3).

Eine mögliche Erklärung für die milden Skelettphänotypen könnte eine redundante Funktion der beiden nahe verwandten Heparansulfat-6-O-Endosulfatasen sein. Unterstützt wird diese Vermutung durch die zum Teil überlappende Expression während der embryonalen Skelettentwicklung (Abschnitt 3.1.3.). Um dies zu überprüfen wurden beide Genetrap Mauslinien miteinander verpaart und doppelt heterozygote Sulf1^{+/-};Sulf2^{+/-} Tiere generiert. Diese zeigten keine Auffälligkeiten und wurden verwendet, um homozygote Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Doppelmutanten zu züchten. Bei allen Verpaarungen, sowohl der Sulf1^{gt} oder Sulf2^{gt} Einzelmутanten als auch der Sulf1^{+/-};Sulf2^{+/-} oder Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Doppelmutanten wurden keine Abweichungen von der Mendelschen Häufigkeitsverteilung und der Wurfgröße bei den embryonalen Stadien E16,5 bis E18,5 und bei 3 Wochen alten postnatalen Tieren (P21) festgestellt (Anhang 8.5). Dies impliziert, dass selbst Genetrap Doppelmutanten während der Embryonalentwicklung (und in den ersten Lebenswochen) eine normale Überlebensrate besitzen. Nach dem Absetzen von der Mutter (ab 3. Woche) bis zum

sechsten Lebensmonat zeigten Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Doppelmutanten eine erhöhte Sterblichkeit von 11% (5/47), während diese nur 1% (1/80) bei Sulf1^{+/-};Sulf2^{+/-} Tieren betrug.

Da der relativ milde Skelettphänotyp der Genetrap Doppelmutanten (Abschnitt 3.3.2.) durch die hypomorphen Genetrap Allele bedingt sein könnte, wurden vergleichend auch doppelt homozygote Null-Mutanten untersucht. Bei diesen, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Dierks (Universität Bielefeld) generierten, Deletions-Mutanten (Sulf1^{-/-};Sulf2^{-/-}) war die Wurfgröße verkleinert und die Sulf1^{-/-};Sulf2^{-/-} Jungtiere zeigten eine erhöhte Sterblichkeit von 54% innerhalb der ersten sechs Lebenswochen (Lamanna et al., 2006, 2007).

3.3.1. Reduziertes Körpergewicht bei Sulf1;Sulf2 Doppelmutanten

Im Vergleich mit Sulf1^{+/-};Sulf2^{+/-} Kontrolltieren war das Körpergewicht von gleichaltrigen Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Doppelmutanten auf 91% (P0) bzw. auf 70% (P21) reduziert. Tiere mit drei Genetrap Sulf-Allelen und einem Wildtyp Sulf1⁺ bzw. Sulf2⁺ Allel hatten jedoch in beiden untersuchten Entwicklungsstadien ein normales Körpergewicht (Tab. 3.3.1). Dies bekräftigt die Eingangs aufgestellte Hypothese, dass Sulf1 und Sulf2 zumindest bei der Regulation des Körpergewichts eine redundante Funktion erfüllen. Wie die Messwerte der adulten Tiere zeigten verschwindet bei den überlebenden Genetrap Doppelmutanten die Gewichtsreduktion im Verlauf der Entwicklung. Im Unterschied dazu war das Körpergewicht bei adulten Sulf1^{-/-};Sulf2^{-/-} Tieren auf 60% im Vergleich zu Wildtyp-Tieren reduziert (Tab. 3.3.1; Lamanna et al., 2007). Daraus kann geschlossen werden, dass die hypomorphen Genetrap-Allele zu einem schwächeren Phänotyp als die Null-Allele führen.

Bei den Untersuchungen der P21 Genetraps fielen fünf stark abgemagerte Tiere mit einem Körpergewicht von unter 5 g auf. Drei der fünf Tiere waren homozygot für beide Genetrap-Allele (Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt}) und die beiden anderen Tiere besaßen nur ein Wildtyp Sulf1⁺ (1/5) bzw. Sulf2⁺ (1/5) Allel. Vergleichbar abgemagerte Tiere traten in den Zuchten der Sulf1^{gt} bzw. Sulf2^{gt} Einzelmутanten jedoch nicht auf. Bei weiteren Untersuchungen der Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Doppelmutanten wurden bei einigen (5/21) P21 Tieren Zahnfehlstellungen der oberen und unteren Schneidezähne vorgefunden (Pfeilspitze Abb. 3.3.1B). Diese führen sehr wahrscheinlich zu einer erschwerten Nahrungsaufnahme und könnten damit teilweise zum verringerten Körpergewicht bei tragen.

Tabelle 3.3.1: Reduziertes Körpergewicht bei doppelt homozygoten Tieren.

	N	Mittleres Körpergewicht (g) ± STA	% von +/gt;+/gt	t-Test P-Wert
Neugeboren (P0)				
Sulf1 ^{+/gt} ;Sulf2 ^{+/gt}	7	1,17 ± 0,05		
Sulf1 ^{+/gt} ;Sulf2 ^{gt/gt}	8	1,18 ± 0,08	101%	n.s.
Sulf1 ^{gt/gt} ;Sulf2 ^{+/gt}	26	1,17 ± 0,09	100%	n.s.
Sulf1 ^{gt/gt} ;Sulf2 ^{gt/gt}	21	1,06 ± 0,08	91%	0,0016
Postnatal (P21)				
Sulf1 ^{+/gt} ;Sulf2 ^{+/gt}	28	9,21 ± 1,81		
Sulf1 ^{+/gt} ;Sulf2 ^{gt/gt}	20	8,43 ± 1,87	92%	n.s.
Sulf1 ^{gt/gt} ;Sulf2 ^{+/gt}	32	8,32 ± 1,72	92%	n.s.
Sulf1 ^{gt/gt} ;Sulf2 ^{gt/gt}	21	6,43 ± 1,35	70%	<0,0001
Adulte Genetrap-Mutanten				
Sulf1 ^{+/gt} ;Sulf2 ^{+/gt}	5	28,35 ± 2,13		
Sulf1 ^{gt/gt} ;Sulf2 ^{gt/gt}	5	26,31 ± 3,86	93%	n.s.
Adulte Null-Mutanten				
Sulf1 ^{+/+} ;Sulf2 ^{+/+}	9	33,32 ± 3,13		
Sulf1 ^{-/-} ;Sulf2 ^{-/-}	12	19,91 ± 1,88	60%	<0,0001

Für die Altersstadien P0 und P21 wurden männliche und weibliche Tiere und bei den adulten Tieren wurden nur Männchen im Alter von 5 - 6 Monaten verwendet. Abkürzungen: Anzahl untersuchter Tiere (N), nicht signifikant (n.s.), Standardabweichung (STA).

3.3.2. Reduzierte Skelettgröße bei Sulf1;Sulf2 Doppelmutanten

Die bei lebenden Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Mutanten erkennbaren Veränderungen, wie ein leicht gewellter Schwanz und eine reduzierte Körpergröße deuten auf eine fehlerhafte Skelettentwicklung hin. Um dies zu untersuchen wurde die Anatomie von Alcianblau und Alizarinrot gefärbten Skeletten eingehend untersucht. Dabei wurde eine generelle Verkleinerung des Skeletts festgestellt, welche besonders an der verringerten Tiefe des Brustkorbes deutlich erkennbar ist (Abb. 3.3.1). Zusätzlich weist dieser ein in der Länge verkürztes und caudal verbreitertes Sternum (Brustbein) auf (Abb. 3.3.2E). Bei P21 Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Tieren ist der Radius auf 91% und das Sternum auf 87% im Vergleich zu doppelt heterozygoten Tieren verkürzt (Tab. 3.3.2). Zum Entwicklungsstadium E18,5 ist bereits eine ähnliche Verkürzung von 93% beim Radius und von 94% beim Sternum erkennbar. Bei E18,5 Sulf1^{gt/gt} Einzelmutanten war das Sternum ebenfalls auf 93% verkürzt (Tab. 3.3.2). Bei Sulf1^{-/-};Sulf2^{-/-} Mutanten wurde zum Stadium P0 eine Verkürzung des Radius auf 91% und des Sternums auf 84% im Vergleich zu gleichaltrigen Wildtyp-Tieren festgestellt. Die zum Vergleich untersuchten Skelette von neugeborenen Sulf1^{-/-};Sulf2^{-/-} Tieren waren in ihrer Größe ähnlich reduziert wie die der Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Tiere (Tab. 3.3.2).

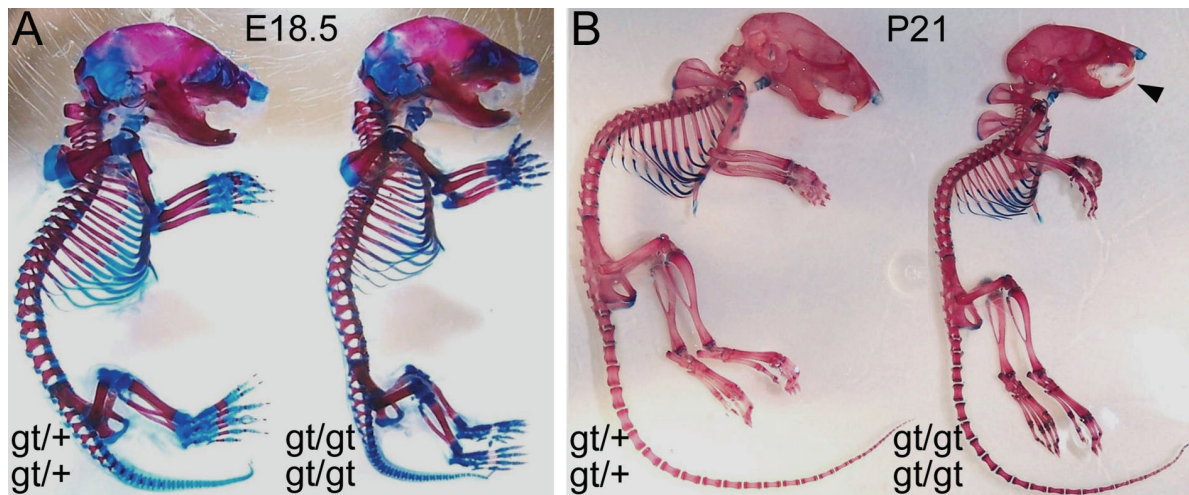


Abb. 3.3.1: Verkleinertes Skelett bei $Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt}$ Doppelmutanten.

Skelettpräparation von E18,5 (A) und P21 (B) von $Sulf1^{+/gt};Sulf2^{+/gt}$ (links) und $Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt}$ (rechts) Wurfgeschwistern. Die Pfeilspitze in (B) zeigt auf die Zahnfehlstellung der $Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt}$ Doppelmutante.

Tabelle 3.3.2: Verkürzte Knochen bei doppelt homozygoten $Sulf1;Sulf2$ Tieren.

	N	Mittlere Länge (mm) \pm STA	N	Mittlere Länge (mm) \pm STA	t-Test P-Wert
$Sulf1^{gt}$ Einzelmutanten		$Sulf1^{+/+}$		$Sulf1^{gt/gt}$	
Sternumlänge E18,5	3	$5,15 \pm 0,05$	5	$4,79 \pm 0,17$	93% 0,014
Radiuslänge E18,5	3	$3,32 \pm 0,06$	5	$3,23 \pm 0,11$	97% n.s.
$Sulf2^{gt}$ Einzelmutanten		$Sulf2^{+/+}$		$Sulf2^{gt/gt}$	
Sternumlänge E18,5	7	$5,28 \pm 0,12$	7	$5,15 \pm 0,11$	98% n.s.
Radiuslänge E18,5	7	$3,45 \pm 0,10$	7	$3,37 \pm 0,08$	98% n.s.
$Sulf1^{gt};Sulf2^{gt}$ Doppelmutanten		$Sulf1^{+/gt};Sulf2^{+/gt}$		$Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt}$	
Sternumlänge P21	7*	$10,47 \pm 0,35$	12	$9,06 \pm 0,51$	87% <0,0001
Sternumlänge P0		n.u.	12	$4,54 \pm 0,26$	n.u.
Sternumlänge E18,5	11	$4,71 \pm 0,32$	13	$4,42 \pm 0,36$	94% 0,046
Radiuslänge P21	7*	$8,71 \pm 0,22$	12	$7,89 \pm 0,33$	91% <0,0001
Radiuslänge P0		n.u.	12	$3,18 \pm 0,10$	n.u.
Radiuslänge E18,5	11	$3,20 \pm 0,11$	13	$2,98 \pm 0,18$	93% 0,0013
$Sulf1^{-};Sulf2^{-}$ Null Doppelmutanten		$Sulf1^{+/+};Sulf2^{+/+}$		$Sulf1^{-};Sulf2^{-}$	
Sternumlänge P0	15	$5,54 \pm 0,32$	16	$4,65 \pm 0,41$	84% <0,0001
Radiuslänge P0	15	$3,64 \pm 0,12$	16	$3,33 \pm 0,29$	91% 0,0006

Die Knochenlänge wurde an Alcianblau und Alizarinrot gefärbten Skelett-Präparationen gemessen. Dabei wurde das Sternum vom cranialen Ende des Manubriums bis zur cranialen Seite des verknöcherten Xiphoid vermessen, ohne die variable Länge des knorpeligen Xiphoids zu berücksichtigen. P0 $Sulf1^{-};Sulf2^{-}$ Mutanten wurden mit gleichaltrigen Wildtyp-Tieren aus getrennten Verpaarungen verglichen. Abkürzungen: Anzahl untersuchter Tiere (N), nicht signifikant (n.s.), nicht untersucht (n.u.) Standardabweichung (STA). (*) Die sieben P21 Kontrolltiere hatten unterschiedliche Genotypen: 4x $Sulf1^{+/gt};Sulf2^{+/gt}$, 1x $Sulf1^{+/+};Sulf2^{+/gt}$, 1x $Sulf1^{gt/+};Sulf2^{+/+}$ und 1x $Sulf1^{+/+};Sulf2^{+/+}$.

3.3.3. Skelettfehlbildungen bei Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Doppelmutanten

Obwohl die meisten Skelettelemente im Großen und Ganzen normal angelegt waren, konnten bei nahezu allen Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Doppelmutanten vier unterschiedliche Skelettveränderungen nachgewiesen werden (Tab. 3.3.3 und 3.3.4). Allgemein nahm die Penetranz (Häufigkeit der Veränderung) und die Stärke der Ausprägung mit steigender Anzahl an Genetrap-Allelen zu und war bei den knock-out Sulf1^{-/-};Sulf2^{-/-} Doppelmutanten (Null-Mutanten) am höchsten.

- (1) Bei Wildtyp-Mäusen besteht das Sternum aus sechs verknöcherten Elementen die von cranial nach caudal als Manubrium sterni, Sternebrae 1 bis 4 (st1 - st4) und Xiphoid bezeichnet werden. Diese Elemente sind durch unechte Gelenke aus hyalinen Knorpel (*Synchondroses sternales*) voneinander getrennt (Abb. 3.3.2A; Tab. 3.3.3). Bei einigen postnatalen Sulf1^{gt/gt} bzw. Sulf2^{gt/gt} Einzelmutanten war eine schmale knöcherne Verbindung von st3 und st4 erkennbar (Tab. 3.3.3 und Daten nicht gezeigt). Dieser Phänotyp trat bei Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Doppelmutanten mit nahezu voller Penetranz (94%) und in stärkerer Ausprägung auf, da bei 65% der Tiere st3 und st4 vollständig verwachsen, sowie bei 18% der Tiere auch st2 und st3 teilweise miteinander verbunden waren (Abb. 3.3.2E; Tab. 3.3.3). Bei Sulf1^{-/-};Sulf2^{-/-} Doppelmutanten zeigten alle untersuchten Skelette vollständig verwachsene st3 und st4 und 40% auch teilweise verbundene st2 und st3 auf (Abb. 3.3.2F; Tab. 3.3.3).

Bei der sorgfältigen Untersuchung perinataler Skelette (E18,5 bis P1) konnten sowohl schmale als auch breite knöcherne Verbindungen zwischen zwei oder drei Sternebrae (Abb. 3.3.2B,C) bei Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Doppelmutanten bereits zum Zeitpunkt E18,5 festgestellt werden (Tab. 3.3.4). Zum Zeitpunkt P0/P1 zeigten 85% der Genetrap Doppelmutanten Sternebrae-Fusionen in unterschiedlich starker Ausprägung, jedoch waren nie mehr als 3 Sternebrae miteinander verwachsen. Im Gegensatz dazu, waren bei allen Null-Doppelmutanten verwachsene Sternebrae vorhanden, wobei bei 29% der Tiere nahezu die gesamte Länge des Sternums betroffen war (Fusion von Manubrium und drei oder vier Sternebrae; Abb. 3.3.2C; Tab. 3.3.4).

Asymmetrisch am Sternum inserierende Rippenpaare, welche sekundär zu Verwachsungen der Sternebrae führen, traten bei wenigen perinatalen Wildtyp-Tieren (6%, 2/33) und Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Doppelmutanten (3%, 1/29) auf. Diese Tiere wurden von der Analyse ausgeschlossen.

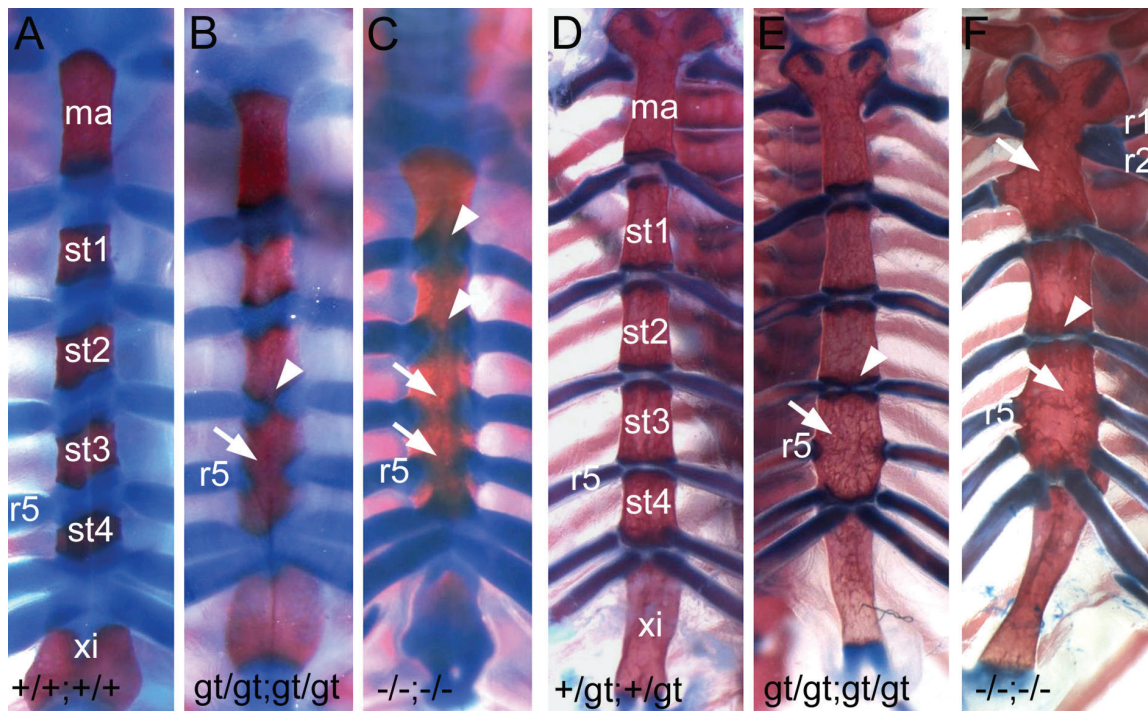


Abb. 3.3.2: Veränderungen im Sternum bei Sulf1;Sulf2 Doppelmutanten.

Blick von ventral auf das Sternum von P0 (A-C) und P21 (D,E) und P47 (F) Tieren. Die entsprechenden Genotypen sind im unteren Bildrand angegeben. Die Pfeile zeigen auf breite Verwachsungen und die Pfeilspitzen auf schmale knöcherne Verbindungen zwischen den Sternebrae. Die Grenze zwischen st3 und st4 ist durch die 5. Rippe (r5) markiert. (F) Eine Verbindung der 1. und der 2. Rippe (r1 und r2) wurde nur bei diesem abgebildeten Tier vorgefunden. Abkürzungen: Manubrium sterni (ma), Sternebrae (st bis st4), Xiphoid (xi).

- (2) Wie in der Einleitung beschrieben wurde, wird die Wirbelsäule in fünf Abschnitte, bestehend aus Cervikal-, Thorakal-, Lumbal-, Sakral- und Caudalwirbeln, unterteilt. Während der Embryonalentwicklung beginnt die Verknöcherung der Wirbelkörper in zwei lateralen und einem zentralen Ossifikationszentrum (Abb. 3.3.3A). Im weiteren Verlauf verbinden sich diese und bilden schließlich den knöchernen Wirbelkörper aus. Zum Zeitpunkt E18,5 sind diese Ossifikationszentren im zweiten Sakralwirbel (S2) noch getrennt und zum Zeitpunkt (P0/P1) sind diese bei 39% der Wildtyp-Tiere durch dünne verknöcherte Bereiche verbunden (Tab. 3.3.4). Anterior von S2 gelegene Wirbel wie der erste Sakralwirbel (S1), die Lumbalwirbel und Thorakalwirbel zeigten zu diesem Zeitpunkt keine Verbindung der Ossifikationszentren. Im Unterschied dazu finden sich bei 86% der E18,5 Sulf2^{gt/gt} Einzelmутanten knöcherne Verbindungen im S2 und bei 42% der Tiere auch in 1 bis 5 Wirbeln anterior von S2 (Tab. 3.3.4). Dieser Phänotyp trat verstärkt bei 92% der Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Doppelmutanten auf (Tab. 3.3.4). Bei den Genetrap-Doppelmutanten beschränkten sich diese Verwachsungen auf Sakral- und Lumbalwirbel, während

50% der Null-Doppelmutanten knöcherne Verbindungen in bis zu 12 Wirbeln auch in der Thorakalregion aufwiesen (Tab. 3.3.4). Da weder Sulf1^{gt/gt} Einzelmутanten noch Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{+/-} Mutanten eine beschleunigte Verknöcherung der Wirbelkörper zeigen, scheint Sulf2 ein Hauptregulator für diesen Prozess zu sein (Abb. 3.3.3A,B; Tab. 3.3.4 und Daten nicht gezeigt).

Tabelle 3.3.3: Skelettveränderungen bei postnatalen (≥ P21) Tieren.

Genotyp Sulf1:	+/+	gt/gt	+/+	+/-	gt/gt	-/-
Genotyp Sulf2:	+/+	+/+	gt/gt	+/-	gt/gt	-/-
Anzahl untersuchter Skelette	9	7	6	4	17	5
Sternebrae verwachsen						
2 Sternebrae teilweise (st3+st4)	0	2 (29)	0	0	5 (29)	0
2 Sternebrae vollständig (st3+st4)	0	0	0	0	8 (47)	3 (60)
3 Sternebrae verwachsen (st2+st3+st4)*	0	0	0	0	3 (18)	2 (40)
Gesamtzahl betroffener Tiere	0	2 (29)	0	0	16 (94)	5 (100)
Wirbel dorsal offen						
1 Wirbel betroffen	2 (22)	4 (57)	1 (17)	2 (50)	7 (41)	1 (20)
2 Wirbel betroffen	0	1 (14)	0	1 (25)	3 (18)	3 (60)
3 bis 6 Wirbel betroffen	0	0	0	0	5 (29)	1 (20)
Gesamtzahl betroffener Tiere	2 (22)	5 (71)	1 (17)	3 (75)	15 (88)	5 (100)
Schwanzwirbel verwachsen						
2 bis 3 Wirbel verwachsen	0	0	0	2 (50)	4 (23)	0
4 bis 7 Wirbel verwachsen	0	0	0	0	12 (71)	4 (80)
Gesamtzahl betroffener Tiere	0	0	0	2 (50)	16 (94)	4 (80)

Die Werte in Klammern sind Prozentangaben. Abkürzungen: Cervicalwirbel (C1 - C7), Lumbalwirbel (L1 - L6), Sternebra (st1 - st4), Thorakalwirbel (T1 - T13). (*) Bei diesen Tieren sind st2+st3 vollständig und st3+st4 teilweise verwachsen, abgesehen von einem Sulf1^{-/-};Sulf2^{-/-} Tier mit vollständig verwachsenem st2+st3+st4.

- (3) In der weiteren Wirbelentwicklung wachsen die Neuralbögen links und rechts um das Rückenmark herum und verschmelzen auf der dorsalen Seite miteinander. In postnatalen Tieren (P21 oder älter) war ein einzelner, dorsal offener Neuralbogen (meist am 10. Thorakalwirbel, T10) mit einer geringen Penetranz von circa 20% in allen untersuchten Genotypen erkennbar (Tab. 3.3.3). Eine erhöhte Häufigkeit von mindestens einem offenen Wirbel findet sich in 71% der Sulf1^{gt/gt} Einzelmутanten und in 88% der Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Doppelmutanten. Stärker betroffene Phänotypen mit 2 bis 6 offenen Wirbeln fanden sich bei 14% der Sulf1^{gt/gt} Einzelmутanten, 47% der Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} und 80% der Sulf1^{-/-};Sulf2^{-/-} Doppelmutanten (Abb. 3.3.3C-E; Tab. 3.3.3). Im Gegensatz zur beschleunigten Ossifikation der Wirbel, die wie im Punkt (2) beschrieben von Sulf2 beeinflusst wird, erscheint die dorsale Vereinigung der Neuralbögen hauptsächlich von Sulf1 beeinflusst zu sein.

- (4) Bei P21 oder älteren Tieren traten mineralisierte Verbindungen von bis zu 7 Schwanzwirbeln bei 94% der $\text{Sulf1}^{\text{gt/gt}};\text{Sulf2}^{\text{gt/gt}}$ und 80% der $\text{Sulf1}^{-/-};\text{Sulf2}^{-/-}$ Doppelmutanten auf, solche Veränderungen waren bei keinem Wildtyp-Tier erkennbar (Abb. 3.3.3H-J; Tab. 3.3.3).

Tabelle 3.3.4: Skelettveränderungen bei perinatalen (E18,5 - P1) Tieren.

Genotyp Sulf1:	+/+		gt/gt	+/+	+/gt		gt/gt	-/-
Genotyp Sulf2:	+/+		+/+	gt/gt	+/gt		gt/gt	-/-
Entwicklungsstadium	E18,5	P0/P1	E18,5	E18,5	E18,5	E18,5	P0/P1	P0/P1
Anzahl untersuchter Skelette	10	23	7	7	11	13	16	21
Sternebrae verbunden bei:								
2 Sternebrae (st3+st4) schmall	0	0	1 (14)	1 (14)	1 (9)	9 (69)	4 (25)	2 (9)
2 Sternebrae (st3+st4) breit	0	0	0	0	0	0	9 (56)	4 (19)
3 Sternebrae (st2+st3+st4)	0	0	0	0	0	2 (16)	3 (19)	9 (43)
≥3 Sternebrae und Manubrium	0	0	0	0	0	0	0	6 (29)
Gesamtzahl betroffener Tiere	0	0	1 (14)	1 (14)	1 (9)	11 (85)	16 (100)	21 (100)
Ossifikationszentren verbunden in:								
Zweiter Sakralwirbel (S2)	0	9 (39)	0	6 (86)	1 (9)	11 (85)	16 (100)	21 (100)
1 bis 2 Wirbel anterior von S2	0	0	0	2 (28)	0	10 (77)	7 (44)	0
3 bis 5 Wirbel anterior von S2	0	0	0	1 (14)	0	2 (15)	8 (50)	10 (48)
6 bis 12 Wirbel anterior von S2	0	0	0	0	0	0	1 (6)	11 (52)
Gesamtzahl betroffener Tiere (ant. S2)	0	0	0	3 (42)	0	12 (92)	16 (100)	21 (100)

Die Werte in Klammern sind Prozentangaben. Abkürzungen: Sternebra 2 - 4 (st2 - st4), Zweiter Sakralwirbel (S2).

Neben den eben beschriebenen vier Hauptveränderungen des Achsenskeletts waren bei perinatalen $\text{Sulf1}^{\text{gt/gt}};\text{Sulf2}^{\text{gt/gt}}$ Doppelmutanten weitere Veränderungen mit geringerer Penetranz erkennbar. Dazu gehört beispielsweise der unvollständig geschlossene Basisphenoid in der Schädelbasis (5/22) und der dorsal fehlgebildete zweite Cervicalwirbel (C2) (9/29) (Abb. 3.3.3F,G,K,L). Bei drei dieser Tiere war am C2 ein ventrales Tuberculum erkennbar, welches normalerweise nur am ersten Cervicalwirbel (C1) vorhanden ist (Abb. 3.3.3N,O). Dies könnte auf eine homeotische Transformation des C2 zum weiter anterior gelegenen C1 hindeuten. $\text{Sulf1}^{-/-};\text{Sulf2}^{-/-}$ Doppelmutanten zeigten einen offenen Basisphenoid (10/10) sowie dorsal veränderten C2 (11/20) mit höheren Häufigkeiten (Abb. 3.3.3M,P; Tab. 3.3.4; Daten nicht gezeigt).

Zu betonen ist, dass bei keiner der untersuchten Mutanten Veränderungen im Extremitätenskelett festgestellt wurden.

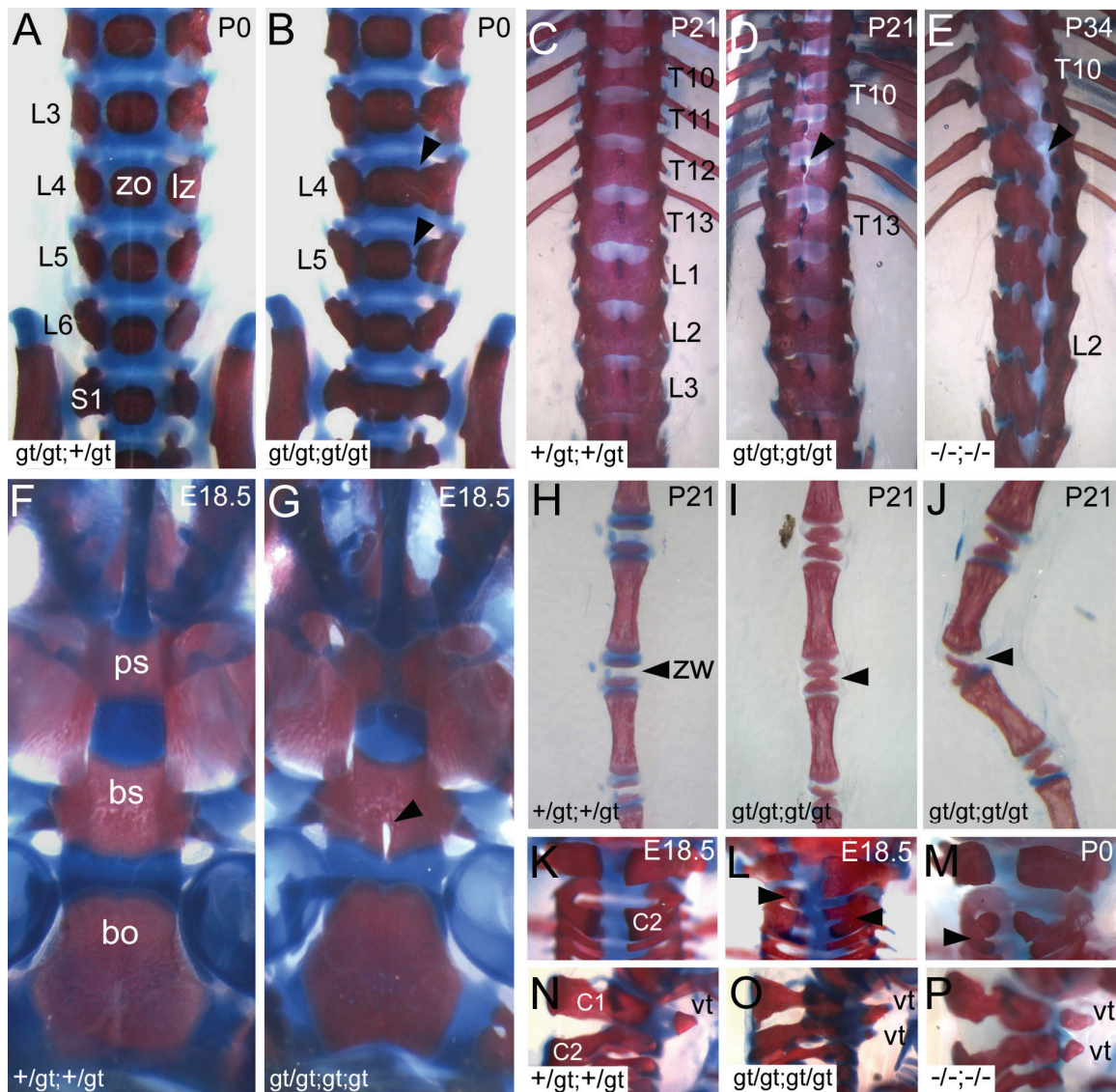


Abb. 3.3.3: Skelettveränderungen an Wirbeln und Schädelbasis.

(A,B) Blick von ventral auf die Lendenwirbelsäule von $\text{Sulf1}^{\text{gt/gt}};\text{Sulf2}^{+/gt}$ (A) und $\text{Sulf1}^{\text{gt/gt}};\text{Sulf2}^{\text{gt/gt}}$ (B) neugeborenen Wurfgeschwistern. Die Pfeilspitzen weisen auf die knöchernen Verbindungen zwischen dem zentralen Ossifikationszentrum (zo) und dem lateralen Ossifikationszentrum (lz) hin. (C-E) Blick von dorsal auf die Rückenwirbelsäule von P21 $\text{Sulf1}^{+/gt};\text{Sulf2}^{+/gt}$ (C), P21 $\text{Sulf1}^{\text{gt/gt}};\text{Sulf2}^{\text{gt/gt}}$ (D) und P34 $\text{Sulf1}^{-/-};\text{Sulf2}^{-/-}$ (E) Tieren. Dorsal offene Neuralbögen (Pfeilspitze) sind bei T10 bis T13 in (D) und T10 bis L2 in (E) erkennbar. (F,G) Blick von superior auf die Schädelbasis von E18,5 $\text{Sulf1}^{+/gt};\text{Sulf2}^{+/gt}$ (F) und $\text{Sulf1}^{\text{gt/gt}};\text{Sulf2}^{\text{gt/gt}}$ (G) Wurfgeschwistern. Die Pfeilspitze in (G) zeigt auf den unvollständig geschlossenen Basisphenoid. (H-J) Fünfter bis achter Schwanzwirbel (gezählt von der Schwanzspitze) von P21 $\text{Sulf1}^{+/gt};\text{Sulf2}^{+/gt}$ (H) und $\text{Sulf1}^{\text{gt/gt}};\text{Sulf2}^{\text{gt/gt}}$ (I,J) Tieren. Durch das Fehlen der Zwischenwirbelscheiben (zw) in (I) und (J) kommt es zu direkten Verwachsungen benachbarter Wirbel (Pfeilspitzen). (K-P) Blick von dorsal (K-M) und lateral (N-P) auf die Cervicalwirbel C1 (Atlas) und C2 (Axis) von E18,5 $\text{Sulf1}^{+/gt};\text{Sulf2}^{+/gt}$ (K,N) und $\text{Sulf1}^{\text{gt/gt}};\text{Sulf2}^{\text{gt/gt}}$ (L,O) und P0 $\text{Sulf1}^{-/-};\text{Sulf2}^{-/-}$ Mutanten (M,P). Die gespaltenen Neuralbögen der C2 Wirbel (Pfeilspitze) sind erkennbar. In einigen Fällen trägt der C2 bei den Doppelmutanten ein ventrales Tuberculum (vt) (O,P). Abkürzungen: Basisphenoid (bs), Basioccipital (bo), Cervicalwirbel (C1 bis C7), Lumbalwirbel (L1 bis L6), Präsphenoïd (ps), Sacralwirbel (S1 bis S4), Thorakalwirbel (T1 bis T13).

3.3.4. Verkürzte proliferierende Zone im Radius

Wie bereits im Abschnitt 3.3.2. beschrieben wurde, ist bereits im Embryonalstadium E18,5 der Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Doppelmutanten die Länge des Radius auf 93% verkürzt. Um mögliche Veränderungen der endochondralen Ossifikation auf zellulärer Ebene zu identifizieren, wurden histologische Untersuchungen an Radius-Längsschnitten von jüngeren Stadien (E16,5) durchgeführt. Ähnlich wie beim Stadium E18,5 war die Gesamtlänge des Radius bei E16,5 Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Doppelmutanten auf 89% ($p = 0.0004$) reduziert (Tab. 3.3.5). An den Alcianblau gefärbten Schnitten (Methodenteil 2.2.2.) lassen sich morphologisch drei Bereiche voneinander abgrenzen: die Zone der proliferierenden Chondrozyten, die Zone der hypertrophen Chondrozyten und die Zone des mineralisierten Knochens (Abb. 3.3.4). Beim Vergleich der longitudinalen Ausdehnung der Zonen von Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Doppelmutanten mit Sulf1^{+/-gt};Sulf2^{+/-gt} Embryonen, zeigte nur die Zone der proliferierenden Chondrozyten eine signifikante Verkürzung auf 90% ($P < 0.0001$). Die Unterschiede der verknöchernden Zone (84%) und der hypertrophen Zone (97%) waren hingegen nicht signifikant (Tab. 3.3.5).

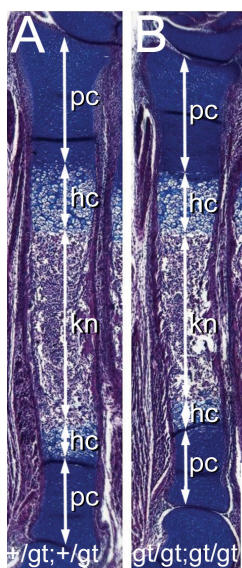


Tabelle 3.3.5: Längenmessung der Zonen bei E16,5 Radii.

	N	Mittlere Länge (mm) \pm STA	N	Mittlere Länge (mm) \pm STA	t-Test P-Wert
	Sulf1 ^{+/-gt} ;Sulf2 ^{+/-gt}		Sulf1 ^{gt/gt} ;Sulf2 ^{gt/gt}		
Gesamtlänge Radius	11	2,32 \pm 0,13	9	2,07 \pm 0,12	89% 0,0004
Verknöcherte Zone	11	0,76 \pm 0,14	9	0,64 \pm 0,15	84% n.s.
Hypertrophe Zone	11	0,46 \pm 0,04	9	0,44 \pm 0,05	97% n.s.
Proliferierende Zone	11	1,10 \pm 0,03	9	0,99 \pm 0,04	90% <0,0001

Bei E16,5 Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Tieren ist die Gesamtlänge des Radius, sowie die Zone der proliferierenden Chondrozyten im Vergleich zu Sulf1^{+/-gt};Sulf2^{+/-gt} signifikant verkürzt. In der Tabelle ist die Summe aus distalem und proximalem Anteil der proliferierenden Zone bzw. der hypertrophen Zone angegeben.

Abb. 3.3.4: Verkürzte Zone der proliferierenden Chondrozyten bei E16,5 Radii.

Histologisch angefärbte Längsschnitte durch E16,5 Radii von (A) Sulf1^{+/-gt};Sulf2^{+/-gt} und (B) Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Embryonen (distales Ende ist oben). Die Knorpelmatrix ist mit Alcianblau gefärbt, das übrige Gewebe erscheint durch die Haematoxylin/Eosin Färbung-violett. Die Längen der einzelnen Zonen wird durch Pfeile markiert. Abkürzungen: proliferierende Chondrozyten (pc), hypertrophe Chondrozyten (hc) und Knochen (kn). Maßstabsbalken in (B) entspricht 500 μ m.

Um zu klären, ob möglicherweise eine verringerte Proliferationsrate der Chondrozyten zur verkürzten proliferierenden Zone führt, wurde diese im distalen Ende von E16,5 Radii bestimmt (Methodenteil 2.2.3.). Für die Analyse wurden zwei morphologisch abgrenzbare Zellpopulationen innerhalb der proliferierenden Zone

unterschieden: Zone I bestehend aus runden Chondrozyten und Zone II bestehend aus abgeflachten Chondrozyten (Abb. 3.3.5). Eine getrennte Auswertung beider Zonen war nötig, da die Zelldichte in Zone I (80 Zellen / 0,01 mm²) größer als in Zone II (62 Zellen / 0,01 mm²) war. Es konnten jedoch keine Unterschiede in der Zelldichte zwischen Kontrolltieren und Doppelmutanten festgestellt werden (Abb. 3.3.5A,B; Tab. 3.3.6). Die Proliferationsrate wurde durch eine phospho-Histon H3 Antikörperfärbung auf den gleichen Gewebeschnitten bestimmt (Methodenteil 2.2.3.). Mit dieser Methode werden Zellkerne, die sich in der M-Phase des Zellzyklus befinden, rot dargestellt (Abb. 3.3.5C,D). Es konnten weder in Zone I noch in Zone II signifikante Unterschiede in der Proliferationsrate zwischen Sulf1^{+/-gt};Sulf2^{+/-gt} und Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Tieren festgestellt werden (Tab. 3.3.7).

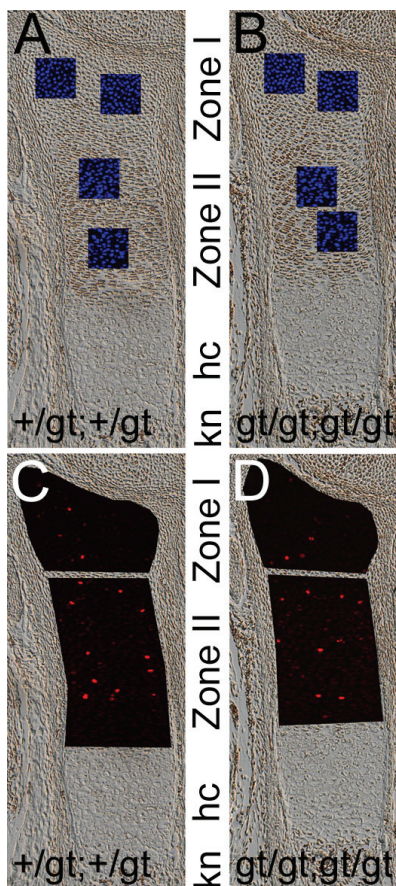


Tabelle 3.3.6: Bestimmung der Zelldichte.

	N	Zellzahl 0,01 mm ² ± STA	in	N	Zellzahl 0,01 mm ² ± STA	in	t-Test	P-Wert
	Sulf1 ^{+/-gt} ;Sulf2 ^{+/-gt}			Sulf1 ^{gt/gt} ;Sulf2 ^{gt/gt}				
Zone I	10	80,5 ± 4,2		9	79,2 ± 4,1	98%	n.s.	
Zone II	10	62,2 ± 3,6		9	62,3 ± 3,9	100%	n.s.	

Die blau dargestellten (Abb. 3.3.5A,B) DAPI gefärbten Zellkerne wurden in zwei 0,01 mm² großen Quadraten in Zone I bzw. II ausgezählt.

Tabelle 3.3.7: Bestimmung der Proliferationsrate.

	N	pHistone3 ⁺ 0,01 mm ² ± STA	in	N	pHistone3 ⁺ in 0,01 mm ² ± STA	in	t-Test	P-Wert
	Sulf1 ^{+/-gt} ;Sulf2 ^{+/-gt}			Sulf1 ^{gt/gt} ;Sulf2 ^{gt/gt}				
Zone I	10	0,58 ± 0,15		9	0,60 ± 0,12	103%	n.s.	
Zone II	10	0,81 ± 0,17		9	0,98 ± 0,25	121%	n.s.	

Die rot dargestellten (Abb. 3.3.5C,D) phospho-Histon H3 positiven (pHistone3⁺) Zellkerne wurden in der gesamten Fläche (schwarz hinterlegt) von Zone I bzw. II gezählt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

Abb. 3.3.5: Zelldichte und Proliferationsrate bei E16,5 Sulf1;Sulf2 Mutanten.

Normalkontroll-Aufnahme des distalen Radius von E16,5 Sulf1^{+/-gt};Sulf2^{+/-gt} (A,C) und Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} (B,D) Wurfgeschwistern (Schnittdicke 7 µm). (A,B) In den überlagert dargestellten Quadraten (Kantenlänge von 100 µm) sind DAPI gefärbte Zellkerne blau dargestellt. (C,D) Die Fläche der schwarz hinterlegten Bereiche in Zone I und II wurde vermessen und die darin enthaltenen rot dargestellten phospho-Histon H3 positiven Zellkerne gezählt und auf 0,01 mm² umgerechnet. Abkürzungen: mineralisierter Knochen (kn), hypertrophe Chondrozyten (hc), Zone I bzw. II der proliferierenden Chondrozyten, nicht signifikant (n.s.).

Mittels *in situ*-Hybridisierung wurde die Expressionsdomänen von Markergenen für unterschiedliche Chondrozyten-Reifestadien ermittelt. So wird *Col10a1* von hypertrophen und terminal-hypertrophen Chondrozyten exprimiert, *Ihh* von prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten, und *Ptch1* von proliferierenden Chondrozyten. Dabei konnte mit keinem der verwendeten Markergene Unterschiede zwischen Doppelmutanten und Kontrolltieren festgestellt werden (Abb. 3.3.6C-N). Des Weiteren konnten keine auffälligen Veränderungen in der Mineralisierung festgestellt werden (*van Kossa*-Färbung, Abb. 3.3.6A,B).

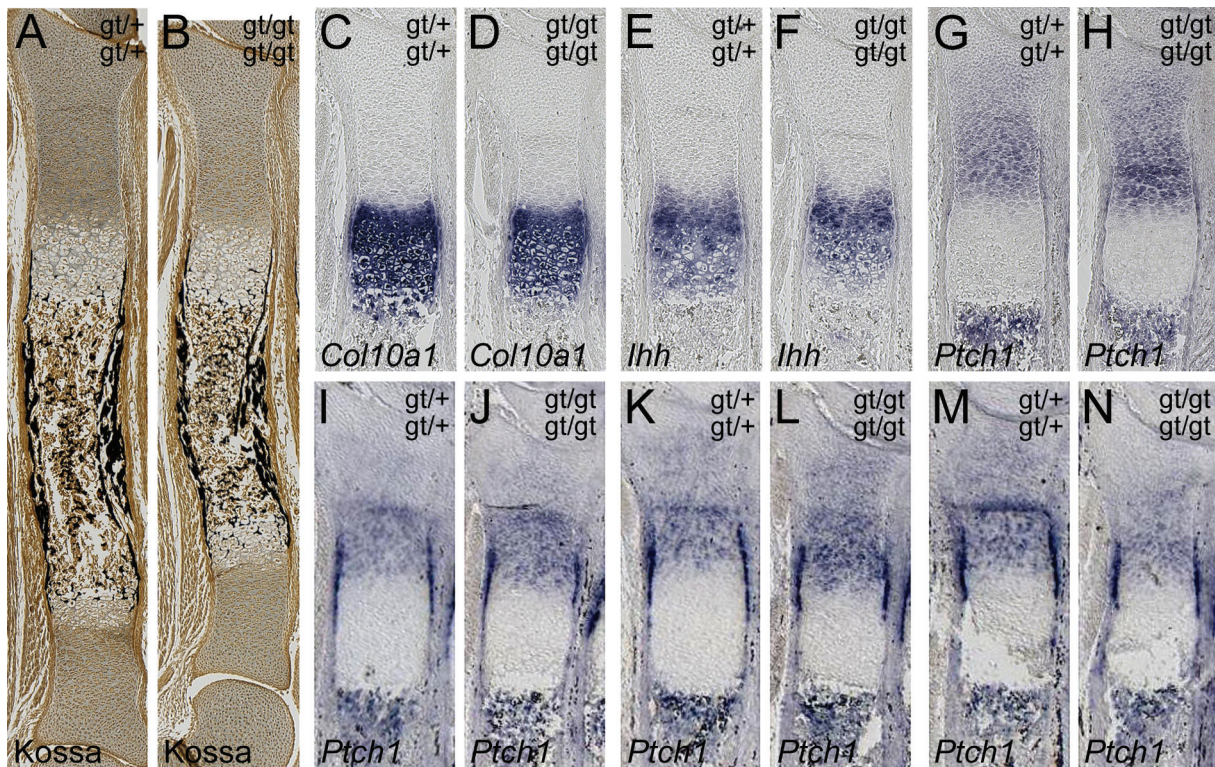


Abb. 3.3.6: Unveränderte Expressionsmuster der Chondrozytenmarker *Col10a1*, *Ihh*, *Ptch1* bei E16,5 Radius bei *Sulf1*;*Sulf2* Doppelmutanten.

Längsschnitte von E16,5 *Sulf1*^{+/gt};*Sulf2*^{+/gt} (A,C,E,G,I,K,M) und *Sulf1*^{gt/gt};*Sulf2*^{gt/gt} (B,D,F,H,J,L,N) Radii. (A,B) Mineralisiertes Gewebe ist mittels *van Kossa*-Färbung schwarz dargestellt. Von diesem Präparat wurden auf Parallelschnitten (C-H) die Chondrozytenmarker *Col10a1* (C,D), *Ihh* (E,F) und *Ptch1* (G,H) durch *in situ*-Hybridisierung dargestellt. Die kräftigere Färbung von *Ptch1* in (H) im Vergleich zu (G) ist vermutlich durch die Färbemethode bedingt. (I-N) In einer weiteren *in situ*-Hybridisierung von *Ptch1* auf Radii von anderen Tieren konnte kein stärkeres *Ptch1* Signal bei den *Sulf1*^{gt/gt};*Sulf2*^{gt/gt} Tieren nachgewiesen werden.

3.3.5. Verkürzte proliferierende Zone im Sternum

Bei Mäusen wird das Sternum (Brustbein) am Tag E12,5 als paarige, bandförmige mesodermale Kondensation (engl.; *sternal bands*) in der dorso-lateralen Körperwand angelegt. Diese Bänder wachsen nach caudal aus und wandern median aufeinander zu. Am Tag E13,5 beginnen sie craniocaudal zu verschmelzen und sind am Tag E16,5 über ihre gesamte Länge verbunden. Mit dem zunächst vollständig aus Knorpel bestehendem Sternum sind 7 Paar Rippen (*Costae*) verbunden. Ab dem Entwicklungsstadium E16,5 beginnt im intercostal, d.h. zwischen den Rippen, gelegenen Bereich des Sternums die hypertrophe Differenzierung. Die daraus entstehenden sechs verknöcherten Bereiche: Manubrium, Sternebrae 1 bis 4 und Xiphoid, werden jeweils auf Höhe der Rippenansätze durch hyalinen Knorpel (*Synchondroses sternales*) voneinander getrennt (Chen, 1952).

Versuche mit kultivierten Sternum-Explantaten *ex vivo* ergaben, dass die operative Entfernung einer Rippe zur Fusion von angrenzenden Sternebrae führt (Chen, 1953). Die Rippen scheinen daher unbekannte sezernierte Faktoren (Signalmoleküle) auszusenden, welche die Ausbildung der *Synchondroses sternales* induziert und deren Verknöcherung verhindert (Chen, 1952, 1953; Storm & Kingsley, 1996). Die veränderte Sternum-Segmentierung bei den *Sulf1*;*Sulf2* Doppelmutanten (Abb. 3.3.2) könnte daher möglicherweise durch eine fehlerhafte Anlage der *Synchondroses sternales* oder durch Störungen im Verlauf ihrer Entwicklung zustande gekommen sein.

Wie bereits in der Einleitung (Abschnitt 1.2.) beschrieben, durchlaufen Chondrozyten verschiedene Differenzierungsstadien, von proliferierenden Chondrozyten, über prähypertrophen Chondrozyten, zu hypertrophen Chondrozyten. Diese Zellpopulationen können durch den Nachweis von spezifischen Markergenen mittels Antisense-RNA *in situ*-Hybridisierungen identifiziert werden. Zum Zeitpunkt E15,5 war an Längsschnitten durch das Sternum von *Sulf1*^{gt/gt};*Sulf2*^{gt/gt} Mutanten kein Unterschied zu *Sulf1*^{+/gt};*Sulf2*^{+/gt} Tieren erkennbar (Daten nicht gezeigt). Zum Zeitpunkt E16,5 und E18,5 wurden hingegen Unterschiede zwischen beiden Genotypen mit den Chondrozyten-spezifischen Differenzierungsmarkern, *Col10a1* und *Ptch1* identifiziert. (1.) Eine vergrößerte Zone von *Col10a1* exprimierenden hypertrophen Chondrozyten in den Sternebrae von E16,5 Doppelmutanten (Abb. 3.3.7A,B). (2.) Eine verkleinerte Zone undifferenzierter Chondrozyten zwischen den *Ptch1*-exprimierenden Chondrozyten benachbarter Sternebrae bei E16,5 und E18,5

Doppelmutanten (rote Pfeile in Abb. 3.3.7C,D,G,H). Bei stark betroffenen Tieren waren keine undifferenzierten Chondrozyten zwischen st3 und st4 bei E18,5 Doppelmutanten erkennbar (Abb. 3.3.7E,F). Eine mögliche Erklärung für diese Befunde scheint eine beschleunigte Chondrozyten-Differenzierung zu sein, die zur Verknöcherung der *Synchondroses sternales* und schließlich zur Verschmelzung benachbarter Sternebrae führt.

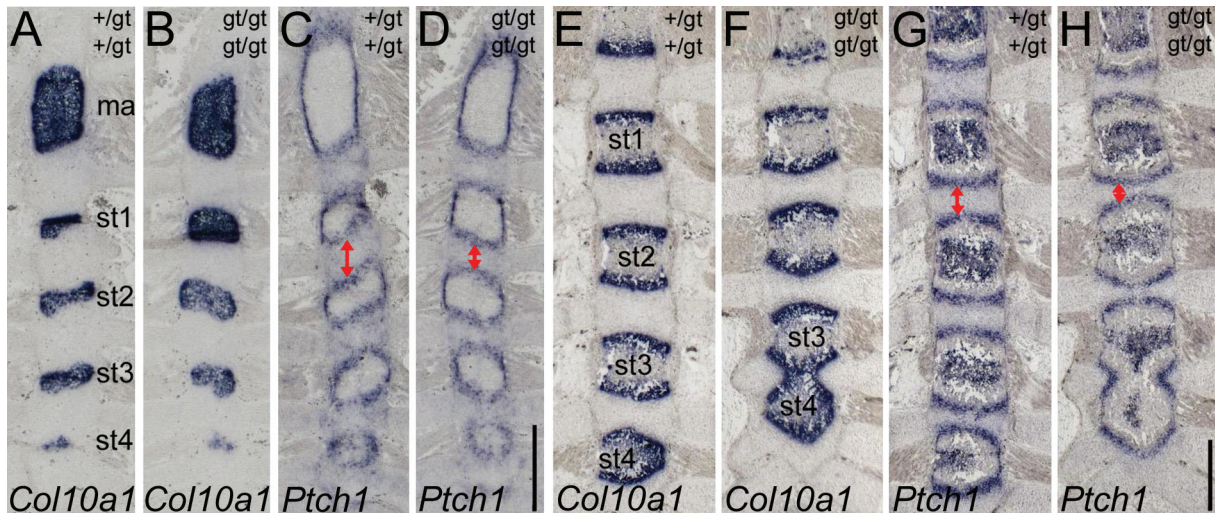


Abb. 3.3.7: Veränderungen in der Chondrozyten Population im Sternum.

In situ-Hybridisierung von *Col10a1* und *Ptch1* auf benachbarte Längsschnitte durch das Sternum von E16,5 (A-D) und E18,5 (E-H) *Sulf1*^{+/gt};*Sulf2*^{+/gt} (A,C,E,G) und *Sulf1*^{gt/gt};*Sulf2*^{gt/gt} (B,D,F,H) Tieren. **(A-D)** Am Tag E16,5 ist die Zone der *Col10a1* exprimierenden hypertrophen Chondrozyten in den Sternebrae der Doppelmutanten vergrößert (A,B) und der Bereich zwischen den *Ptch1* exprimierenden proliferierenden Chondrozyten verkleinert (rote Pfeile in C,D). **(E-H)** Am Tag E18,5 ist ebenfalls eine Verkleinerung der Zone zwischen den *Ptch1* Expressionsdomänen (rote Pfeile in G,H) und eine Fusion der hypertrophen Chondrozyten (*Col10a1* positiv) von st3 und st4 (E,F) in *Sulf1*^{gt/gt};*Sulf2*^{gt/gt} Tieren zu erkennen. Die Maßstabsbalken in (D,H) entsprechen 500 µm.

3.4. Skelettphänotyp der Shh;*Sulf1*;*Sulf2* Dreifachverkreuzung

Bei der Untersuchung von Skelettpräparationen neugeborener *Sulf1*^{gt/gt};*Sulf2*^{gt/gt} Doppelmutanten, zeigten 2 von 29 Tieren eine knöcherne Verbindung von linker und rechter Mandibelspitze (Abb. 3.4.1A-C). Eine solche Veränderung trat jedoch niemals bei Tieren mit mindestens einem *Sulf1*- bzw. *Sulf2*-Wildtyp-Allel auf. Der Unterkiefer (Mandibel) wird im Verlauf der Embryonalentwicklung aus einem Teil des ersten Kiemenbogens gebildet. Wie in Abschnitt 3.1.4. dargestellt, sind *Sulf1* und *Sulf2* im Mesenchym des Kiemenbogens zum Stadium E10,5 teilweise überlappend exprimiert (Abb. 3.1.8F,I). An der Unterkieferentwicklung sind verschiedene Signalmoleküle beteiligt. Dabei kommt dem sezernierten Faktor *Sonic hedgehog* (Shh) eine kritische Funktion zu (Brito et al., 2006). Eine Beeinflussung des Shh-

Signalwegs durch die 6-O-Endosulfatase QSulf1 konnte am Neuralrohr identifiziert werden. Bei diesem Modellsystem führt die Überexpression von QSulf1 zu einer größeren Reichweite des Shh-Signals (Danesin et al., 2006). Die Inaktivierung von Shh in der Maus führt zu schweren Defekten in der Embryonalentwicklung. Homozygote $Shh^{-/-}$ Mutanten sind nicht lebensfähig und weisen im Bereich des Kopfes eine Holoprosencephalie (Mittelliniendefekt) und Zyklopie (ein zentrales Auge) auf. Bei heterozygoten $Shh^{+/-}$ Tieren sind hingegen keine Veränderungen gegenüber Wildtyp-Tieren bekannt (Chiang et al., 1996).

Um die Hypothese zu überprüfen, dass der Verlust von 6-O-Endosulfatasen die Reichweite des Shh-Signaling vermindert, wurden heterozygote $Shh^{+/-}$ Embryonen (E14,5 bis E18,5) mit unterschiedlicher Anzahl an $Sulf1^{gt}$ und $Sulf2^{gt}$ Allelen generiert. Von insgesamt 126 Embryonen fehlte bei 3 Tieren der Unterkiefer vollständig (Agnathie) und bei 2 Embryonen war dieser stark verkürzt (Mikrognathie) (Tab. 3.4.1). Außerdem war bei den agnathen Embryonen der craniofaziale Schädel verschmälert und die Augen verkleinert oder fehlten vollständig (Abb. 3.4.1D).

Tabelle 3.4.1: Mandibelphänotyp bei Shh ; $Sulf1$; $Sulf2$ Dreifachmutanten.

Genotyp			Anzahl untersuchter Embryonen (14,5 - E18,5)	davon mit Mandibel-Phänotyp	Ausprägung vom Phänotyp
Shh	Sulf1	Sulf2			
+/+	+/+	+/+	1	0	
+/+	+/+	+/gt	9	0	
+/+	+/+	gt/gt	4	0	
+/+	+/gt	+/+	3	0	
+/+	gt/gt	+/+	1	0	
+/+	+/gt	+/gt	26	0	
+/+	gt/gt	+/gt	25	0	
+/+	+/gt	gt/gt	23	0	
+/+	gt/gt	gt/gt	8	0	
			Gesamt: 100	Gesamt: 0	
+/-	+/+	+/+	0	0	
+/-	+/+	+/gt	11	1	Mikrognathie
+/-	+/+	gt/gt	6	0	
+/-	+/gt	+/+	11	0	
+/-	gt/gt	+/+	4	0	
+/-	+/gt	+/gt	26	1	Mikrognathie
+/-	gt/gt	+/gt	24	0	
+/-	+/gt	gt/gt	17	0	
+/-	gt/gt	gt/gt	27	3	Agnathie
			Gesamt: 126	Gesamt: 5	

Die Tabelle gibt Anzahl und Genotyp der 226 untersuchten Embryonen (E14,5; E16,5; E18,5) an. Alle Tiere haben einen gemischten Hintergrund aus C57BL10 ($Shh^{+/-}$) und C57BL6x129/Ola ($Sulf1^{gt}$; $Sulf2^{gt}$). Ein stark verkürzter Unterkiefer (Mikrognathie) bzw. ein fehlender Unterkiefer (Agnathie) trat nur bei einigen $Shh^{+/-}$ Embryonen in Kombination mit mindestens einem $Sulf2^{gt}$ Allel (Mikrognathie) bzw. vier Genetrap ($Sulf1^{gt/gt}$; $Sulf2^{gt/gt}$) Allelen (Agnathie) auf.

Unabhängig von der Anzahl der Sulf1^{gt} und Sulf2^{gt} Allele war der Unterkiefer bei allen 100 Shh^{+/-} Embryonen aus dieser Zucht normal entwickelt (Tab. 3.4.1). Des Weiteren wurde bei keinem der zahlreichen Embryonen aus der reinen Sulf1^{gt} und Sulf2^{gt} und Sulf1^{gt};Sulf2^{gt} Zucht (Anhang, Tab. 8.1) ein verkürzter Unterkiefer vorgefunden. Daraus folgt, dass ein Shh^{+/-} Allel eine entscheidende Voraussetzung für einen verkürzten Unterkiefer ist. Da allerdings bei einem der Embryonen mit Mikrognathie neben dem Shh^{+/-} Allel nur ein Sulf2^{gt} Allel mutiert war, lässt sich ein Sulfatase unabhängiger Einfluss von Shh auf die Mandibellänge nicht völlig ausschließen. Da jedoch Agnathie ausschließlich bei Shh^{+/-};Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Dreifachmutanten, wenn auch mit einer geringen Häufigkeit (3 von 27 Embryonen) auftritt, lässt sich die Eingangs aufgestellte Hypothese bekräftigen. Demnach führt die erhöhte HS 6-O-Sulfatierung bei den Sulfatase-Doppelmutanten zu einer verringerten Shh-Signalübertragung, wodurch das Auswachsen des ersten Kieferbogens negativ beeinflusst wird (verwachsene Mandibelspitze bzw. Agnathie in Kombination mit dem Shh^{+/-} Allel).

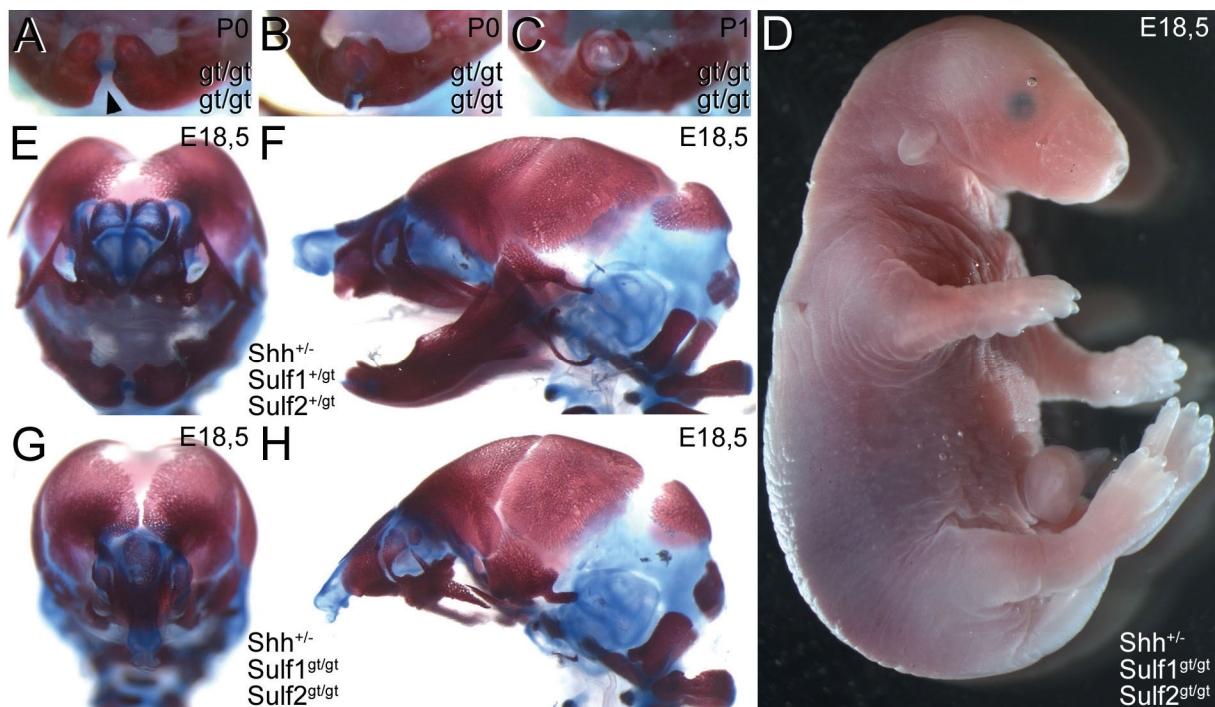


Abb. 3.4.1: Agnathia Phänotyp bei Shh;Sulf1;Sulf2 Dreifachmutanten.

(A-C) Blick von frontal auf die Mandibelspitze von neugeborenen Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Tieren. Bei der Mehrzahl dieser Tiere ist ein normaler Abstand zwischen linker und rechter Mandibel vorhanden (Pfeilspitze in A). Jedoch waren bei 2 von 29 Tieren die linke und rechte Mandibel miteinander verwachsen (B,C). (D) Phänotyp einer Shh^{+/-};Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Dreifachmutante ohne Unterkiefer (Agnathie) und mit verkleinerten Augen. Am Körper und an den Extremitäten sind keine weiteren Veränderungen erkennbar. (E-H) Blick von frontal (E,G) und lateral (F,H) auf Skelettpräparationen von E18,5 Schädeln, eines normal entwickelten Shh^{+/-};Sulf1^{+/-};Sulf2^{+/-} Tieres (E,F) und einem agnathen Shh^{+/-};Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Wurfgeschwister-Tieres (G,H).

3.5. Sulf1 und Sulf2 Überexpressions-Mausmutanten

Komplementär zu den Deletionsmutanten (Abschnitt 3.3.) sollte durch die spezifische Überexpression von Sulf1 bzw. Sulf2 im Knorpelgewebe, die Funktion dieser Genprodukte während der endochondralen Ossifikation näher untersucht werden. Dazu wurden transgene Mäuse generiert, welche die kodierende Sequenz der Sulfatase unter Kontrolle des Kollagen Typ IIa1 (Col2a1) Promotors in den proliferierenden Chondrozyten exprimieren (Abb. 3.5.1, Methodenteil 2.5.1.).

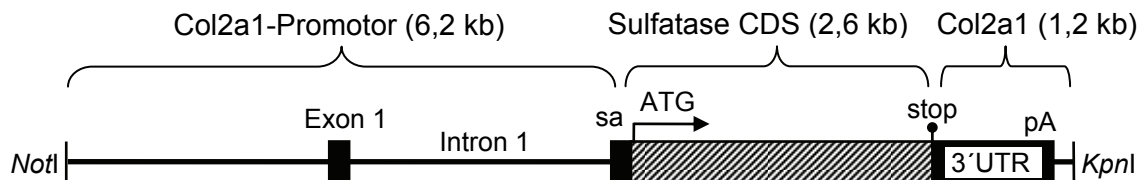


Abb. 3.5.1: Schema des linearisierten Col2a1-Sulfatase-Expressionskonstrukts. Der Proteinkodierende Abschnitt von Sulf1 bzw. Sulf2 ist schraffiert dargestellt. Abkürzungen: Polyadenylierungssignal (pA), Spleiß-Akzeptor (sa), Translations-Startcodon (ATG) und Stopcodon (stop).

Mittels einer PCR basierten Genotypisierungs-Strategie konnte eine Integration der DNA-Konstrukte im Mausgenom mit Primern spezifisch für Col2a1 und Sulf1 bzw. Sulf2 bestimmt werden (Methodenteil 2.6.1. und 2.6.2.). Es wurden 4 von 59 (7%) Jungtiere als positiv für Col2a1-Sulf1 (#199, #202, #204, #208) und 3 von 15 (20%) Tiere als positiv für Col2a1-Sulf2 (#78, #79, #80) ermittelt. Diese sieben Tiere wurden mit FVB/N Wildtyp-Mäusen verpaart, um transgene (tg) Mauslinien zu etablieren. Dies gelang bei vier Mauslinien, welche als: Col2a1-Sulf1^{tg199}, Col2a1-Sulf1^{tg208}, Col2a1-Sulf2^{tg79} und Col2a1-Sulf2^{tg80} bezeichnet wurden. Die geringe Erfolgsquote von 7% (4/59) bei den Col2a1-Sulf1 Tieren könnte möglicherweise an einer erhöhten postnatalen Sterblichkeit der transgenen Tiere liegen. Um dies zu testen wurde das Col2a1-Sulf1-Konstrukt erneut in befruchtete Eizellen injiziert und die Embryonen jedoch am Tag E16,5 (1/8; 13%) und E18,5 (3/9; 33%) den Ammen entnommen. Insgesamt ergab sich eine erhöhte Erfolgsquote von 24% (4/17) bei den Embryonen gegenüber den postnatalen Tieren von 7% (4/59).

3.5.1. Skelettphänotyp der Überexpressions-Mausmutanten

Es wurden Alcianblau und Alizarinrot gefärbte Skelettpräparationen von E18,5 Embryonen der 4 transgenen Mauslinien (#79, #80, #199, #208) und der direkt injizierten Col2-Sulf1 Embryonen untersucht und mit den Wildtyp-Geschwistertieren

verglichen. Exemplarisch für eine mögliche Größenveränderung des Skeletts wurde die Länge von Radius und Sternum gemessen (Tab. 3.5.1).

Tabelle 3.5.1: Radius- und Sternumlänge von Wildtyp- und transgenen Tieren.

	N	Mittlere Länge (mm) \pm STA	N	Mittlere Länge (mm) \pm STA	t-Test P-Wert
Col2-Sulf1 Konstrukt	Wildtyp		Transgen		
Radiuslänge - Embryo #1 (E16,5)	2	2,38 \pm 0,32	1	1,90	80%
Radiuslänge - Embryo #2 (E18,5)	1	3,50	1	3,25	93%
Radiuslänge - Embryo #3 (E18,5)	1	3,45	1	3,55	103%
Radiuslänge - Embryo #4 (E18,5)	2	3,53 \pm 0,04	1	3,50	99%
Radiuslänge - Linie #199 (E18,5)	11	3,29 \pm 0,17	13	2,98 \pm 0,12	91% <0,0001
Radiuslänge - Linie #208 (E18,5)	3	3,32 \pm 0,10	7	3,38 \pm 0,08	102% n.s.
Sternumlänge - Embryo #1 (E16,5)	2	3,35 \pm 0,42	1	2,60	78%
Sternumlänge - Embryo #2 (E18,5)	1	5,25	1	3,25	62%
Sternumlänge - Embryo #3 (E18,5)	1	5,00	1	5,20	104%
Sternumlänge - Embryo #4 (E18,5)	2	5,35 \pm 0,28	1	5,15	96%
Sternumlänge - Linie #199 (E18,5)	11	4,97 \pm 0,34	13	4,37 \pm 0,27	88% <0,0001
Sternumlänge - Linie #208 (E18,5)	3	4,93 \pm 0,13	7	5,00 \pm 0,15	101% n.s.
Col2-Sulf2 Konstrukt	Wildtyp		Transgen		
Radiuslänge - Linie #79 (E18,5)	3	3,37 \pm 0,23	4	3,54 \pm 0,13	105% n.s.
Radiuslänge - Linie #80 (E18,5)	7	3,44 \pm 0,22	4	3,49 \pm 0,19	101% n.s.
Sternumlänge - Linie #79 (E18,5)	3	5,03 \pm 0,21	4	5,11 \pm 0,09	102% n.s.
Sternumlänge - Linie #80 (E18,5)	7	5,08 \pm 0,25	4	5,13 \pm 0,26	101% n.s.

Unterschiede (über 5%) sind durch Fettdruck hervorgehoben. Es wurden direkt injizierte Embryonen #1 bis #4 sowie Embryonen von etablierten Col2a1-Sulf1 Mauslinien #199 und #208, sowie Col2a1-Sulf2 Mauslinien #79 und #80 untersucht. Die Knochenlänge wurde an Skelettpräparationen gemessen, dabei wurde für das Sternum vom cranialen Ende des Manubriums bis zur cranialen Seite des verknöcherten Xiphoid gemessen, ohne die variable Länge des caudalen Xiphoids zu berücksichtigen. Abkürzungen: Anzahl untersuchter Tiere (N), nicht signifikant (n.s.), Standardabweichung (STA).

Von den 4 transgenen Col2-Sulf1 Embryonen waren 2 Tiere unauffällig (#3 und #4) und 1 Tier (Embryo #1) war deutlich kleiner als die Wurfgeschwister, erkennbar an der auf 80% verkürzten Radius- und Sternumlänge. Abgesehen davon waren jedoch keine Skelettfehlbildungen bei Embryo #1 erkennbar. Auffällig an Embryo #2 ist, dass auf 62% verkürzte und caudal verschmälerte Sternum und der auf 93% verkürzte Radius (Abb. 3.5.2C,D,H,I; Tabelle 3.5.1). Außerdem sind an diesem Tier weitere Skelettfehlbildungen erkennbar, wie der gekrümmte Unterkiefer, gespaltener Gaumen, Verschmelzung von Radius und Humerus und fehlende ventrale Fortsätze an den Lumbalwirbeln (Abb. 3.5.2). Keine dieser Veränderungen konnte an den anderen direkt injizierten Embryonen (#1, #3, #4) oder an Nachkommen der 4 transgenen Linien oder an Wildtyp-Tieren beobachtet werden.

Es konnten keine Unterschiede in der Länge und in der Morphologie der Knochen zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren der Linien Col2a1-Sulf1^{tg208}, Col2a1-

Sulf2^{tg79} und Col2a1-Sulf2^{tg80} ermittelt werden (Tabelle 3.5.1). Jedoch sind Transgene Col2a1-Sulf1^{tg199} Tiere deutlich kleiner als ihre Wildtyp-Wurfgeschwister (Abb. 3.5.3A). Dies wird auch bei Längenmessung von Radius (91%) und Sternum (88%) deutlich (Tabelle 3.5.1.). Längsschnitte durch den E16,5 Radius lassen eine verzögerte Mineralisierung bei dieser transgenen Linie erkennen (Abb. 3.5.3E-H).

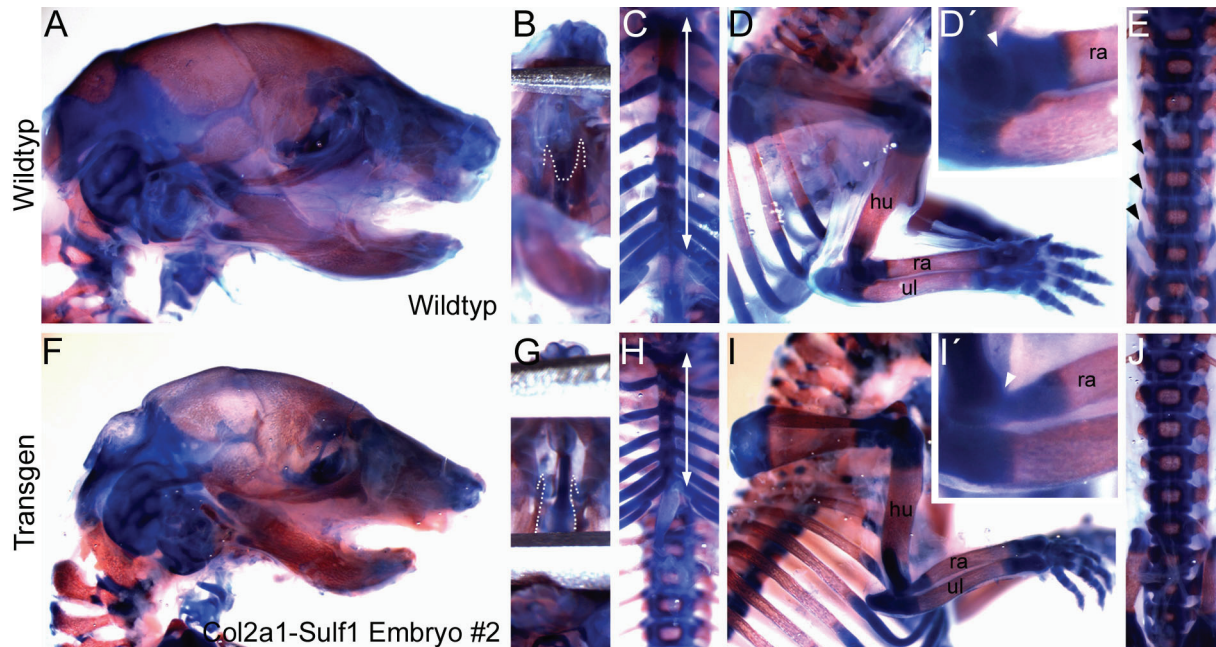


Abb. 3.5.2: Skelettveränderungen des direkt injizierten Col2-Sulf1 Embryo #2.

Normal entwickeltes Skelett eines E18,5 Wildtyp-Tieres (A-E) und fehlgebildetes Skelett des transgenen Wurfgeschwisters Col2a1-Sulf1 Embryo #2 (F-J). Die Veränderungen betreffen (A,F) einen gebogenen Unterkiefer, (B,G) ein offenes Gaumendach (gestrichelte Linie) und (C,H) ein stark verkürztes Sternum (Pfeil). (D,I) Die Knochen der Vorderextremität: Humerus (hu), Radius (ra) und Ulna (ul) bilden das Ellbogengelenk. (D',I') In der 3-fachen Vergrößerung ist beim transgenen Embryo #2 kein Gelenkspalt (Pfeilspitze) zwischen Humerus und Radius ausgebildet. Außerdem hat der proximale Radius eine zugespitzte Form und endet nicht breit wie beim Wildtyp-Embryo. (E,J) An den Lendenwirbeln L4 bis L6 sind im Wildtyp seitliche Fortsätze (Pfeilspitzen) ausgebildet, diese fehlen beim transgenen Embryo #2.

Zusätzlich ist bei 85% (11/13) der transgenen Col2a1-Sulf1^{tg199} Tiere der erste Lumbalwirbel (L1, Lendenwirbel ohne Rippen) als 14. Thorakalwirbel (T14, Brustwirbel mit Rippen) ausgebildet (Abb. 3.5.3B-D). Diese veränderte Wirbelidentität wird auch als homeotische Transformation (L1 → T14) bezeichnet. Die Ausprägung der Rippen am 14. Thorakalwirbel variiert zwischen den 11 betroffenen Tieren. Bei 3 Tieren sind kleine Rippen (1-2 mm) beidseitig und bei weiteren 3 Tieren nur einseitig ausgebildet. Bei den übrigen 5 Tieren sind Rippenrudimente (< 0,5 mm) am T14 vorhanden.

Infolge der homeotischen Transformation (L1 → T14) sind meist 5 anstatt 6 Lumbalwirbel vorhanden. Bei 31% (4/13) der transgenen Col2a1-Sulf1^{tg199}

Embryonen ist eine weitere homeotische Transformation ($S1 \rightarrow L6$) des ersten Sakralwirbels ($S1$, Kreuzwirbel) in den 6. Lumbalwirbel ($L6$) ausgebildet (Abb. 3.5.3B-D). Morphologisch ist der $L6$ durch seinen nach cranial ausgerichteten, spitz zulaufenden seitlichen Fortsatz vom $S1$ mit seinem nach cranial und caudal breit abgeflachten Fortsatz leicht unterscheidbar (Abb. 3.5.3B). Diese homeotische Transformation ist bei 3 von 13 Tieren auf einer Seite ausgebildet d.h., die linke und rechte Seite dieses Wirbels tragen unterschiedlich geformte Fortsätze (Abb. 3.5.3C), und bei 1 von 13 Tieren sind beide Seiten als $L6$ ausgebildet (Abb. 3.5.3D). Keine Unterschiede wurden im Bereich der Halswirbelsäule ($C1$ bis $C7$, Cervikalwirbel) vorgefunden.

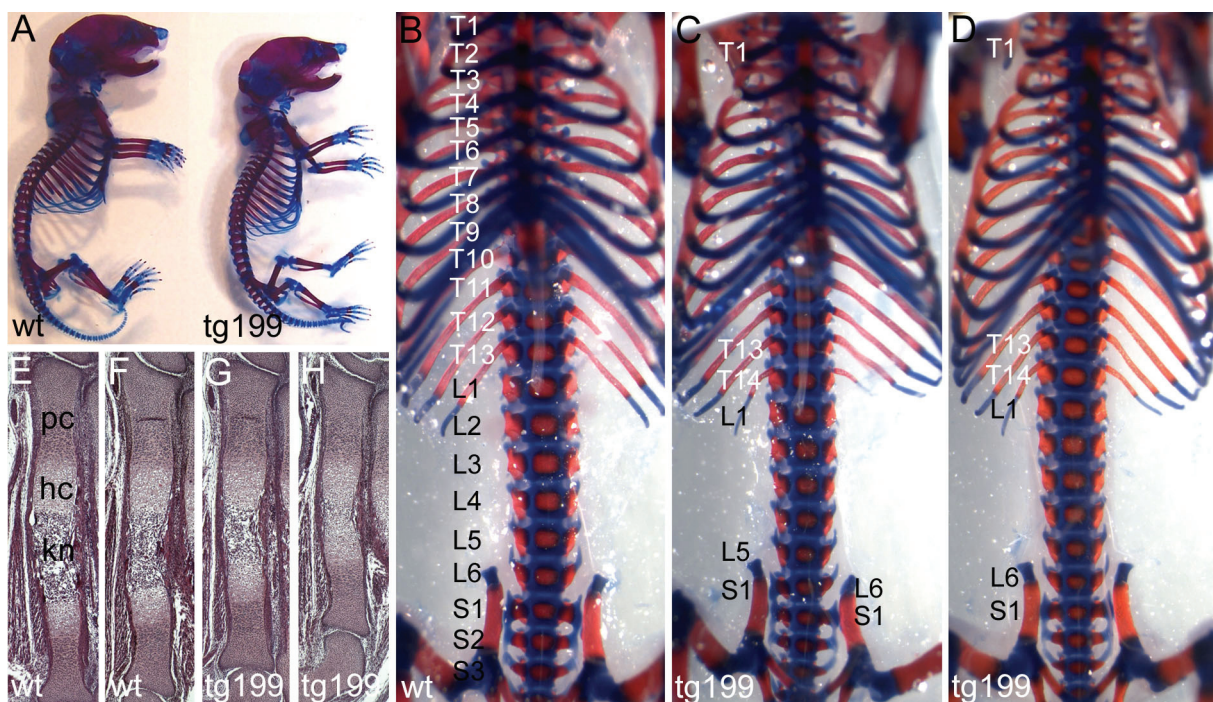


Abb. 3.5.3: Skelettveränderungen der Col2-Sulf1^{tg199} Mauslinie.

(A) Reduzierte Skelettgröße beim transgenen E18,5 Col2a1-Sulf1^{tg199} Embryo (rechts) im Vergleich zum Wildtyp-Wurfgeschwister (links). (B-D) Blick von ventral auf die Wirbelsäule von E18,5 (A) Wildtyp und (B,C) transgenen Col2a1-Sulf1^{tg199} Wurfgeschwistern. Die einzelnen Wirbel sind in (A) fortlaufend mit Thorakalwirbel T1 bis T13, Lumbalwirbel L1 bis L6 und Sakralwirbel S1 bis S3 beschriftet. Eine homeotische Transformation ($L1 \rightarrow T14$) ist an den kleinen Rippen am T14 erkennbar (B,C). Eine einseitige (B) und beidseitige (C) homeotische Transformation ($S1 \rightarrow L6$) ist an den unterschiedlich geformten seitlichen Fortsätzen, typisch für L6 bzw. S1, erkennbar. (E-H) Längsschnitt durch Haematoxylin-Eosin gefärbte E16,5 Radii von Wildtyp (E,F) und transgenen Col2a1-Sulf1^{tg199} Wurfgeschwistern (G,H). Die Gesamtlänge des Radius ist bei den transgenen Tieren (G,H) deutlich verkürzt. Die Länge der einzelnen Zonen ist bei den proliferierenden Chondrozyten (pc) und den hypertrophen Chondrozyten (hc) nur gering verkürzt, aber der Bereich des mineralisierten Knochens (kn) ist stark verkleinert und bei Embryo in (H) ist noch kein Knochen ausgebildet.

3.5.2. Verifizierung der Col2a1-Sulfatase Überexpression

Aus E14,5 Extremitäten von 4 transgenen Mauslinien und von Wildtyp-Tieren wurde cDNA synthetisiert und zwei verschiedene RT-PCRs durchgeführt (Primersequenzen in Tab. 2.5). Als Positivkontrolle diente die „Sulf-PCR“ (Abb. 3.5.4A), bei der Transkripte sowohl vom endogenen Sulfatase-Lokus als auch von der transgenen Sulfatase detektiert werden. Mit dieser PCR konnte in allen 4 transgenen Linien und den Wildtypen cDNA nachgewiesen werden (Abb. 3.5.4B,C; Pfeilspitze oberes Bild). Durch die „tg-PCR“ (Abb. 3.5.4A) werden nur die transgenen Transkripte bestehend aus dem Col2a1-Exon 1 und der Sulfatase-CDS, nicht aber Transkripte der endogenen Sulfatase, detektiert. Mit der „tg-Sulf1-PCR“ konnte nur für die Linie Col2a1-Sulf1^{tg208} nicht aber für die Linie Col2a1-Sulf1^{tg199} transgene *Sulf1*-Transkripte nachgewiesen werden (Abb. 3.5.4B, Pfeilspitze unteres Foto). Die „tg-Sulf2-PCR“ detektiert in beiden Linien Col2a1-Sulf2^{tg79} und Col2a1-Sulf2^{tg80} transgene *Sulf2*-Transkript (Abb. 3.5.4C, Pfeilspitze unteres Foto).

Mit einer zweiten Methode, der antisense RNA *in situ*-Hybridisierung (ISH), sollte die gewebespezifische Überexpression der Sulfatasen bestätigt werden. Zunächst wurden neue *in situ*-Sonden hergestellt, *Sulf1-intern* (Anhang 8.2.2.) und *Sulf2-intern* (Anhang 8.2.3.), da die in Abschnitt 3.1. verwendeten Sonden die 3'UTR-Region der Sulfatasen detektieren, die jedoch nicht in den Col2a1-Sulfatase Konstrukten enthalten sind. Die internen Sonden ergeben ein identisches Expressionsmuster an Wildtyp E14,5 Gewebeschnitten wie die 3'UTR-Sonden (vergleiche Abb. 3.5.4E-H und Abb. 3.1.9A,B). Obwohl die RT-PCR zumindest für Col2a1-Sulf1^{tg208} ein tg-*Sulf1*-Transkript nachweist, ist dies mit der *Sulf1-intern*-Sonde weder in dieser Linie noch in der Col2a1-Sulf1^{tg199} Linie möglich (Abb. 3.5.4I,J). Mit der *Sulf2-intern*-Sonde konnte die in der RT-PCR gezeigten tg-*Sulf2*-Transkripte für die Linien Col2a1-Sulf2^{tg79} und Col2a1-Sulf2^{tg80} auch an Gewebeschnitten nachgewiesen werden (Abb. 3.5.4K,L). Dabei spiegelt die tg-*Sulf2*-Überexpression in den proliferierenden Chondrozyten, dass vom Col2a1-Promotor erwartete Expressionsmuster wieder (Abb. 3.5.4D).

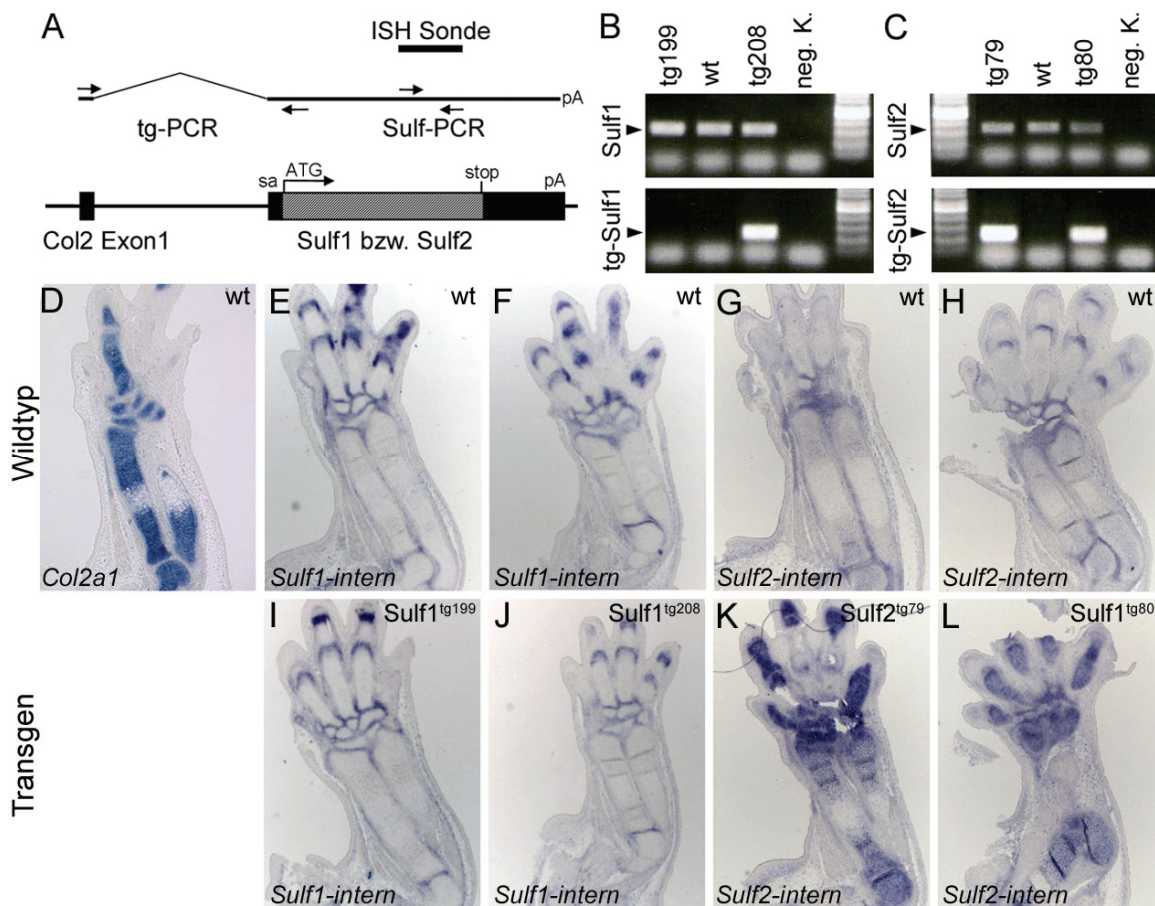


Abb. 3.5.4: Überprüfung der Sulf-Überexpression bei vier transgenen Linien.

(A) Schema des Col2-Sulf1/2 DNA-Konstruktes (unten) und des vom Col2a1-Exon 1 zum Spleiß-Akzeptor (sa) gespleißten mRNA-Transkripts (oben). Die Position der *Sulf1-intern* bzw. *Sulf2-intern* ISH-Sonde ist durch eine dicke Linie und die RT-PCR Primer sind durch Pfeile angegeben. (B,C) RT-PCR Ergebnisse von E14,5 Extremitäten cDNA aus Wildtyp (wt) und den vier transgenen Linien (tg79, tg80, tg199, tg208). Für die Negativkontrolle (neg. K.) wurde die PCR ohne cDNA durchgeführt. (B) Mit der „Sulf1“ Kontroll-PCR (Primer Sulf1-1453-F und Sulf1-1725-R) sind (endogene) *Sulf1*-Transkripte in allen drei Proben nachweisbar (Pfeilspitze oberes Gelfoto). Mit der „tg-Sulf1“ PCR (Primer RT-Col2-Ex1-F und RT-Sulf1-113-R) ist nur bei Col2a1-*Sulf1*^{tg208}, nicht aber bei Col2a1-*Sulf1*^{tg199} überexprimierte *Sulf1*-Transkripte nachweisbar (Pfeilspitze unteres Gelfoto). (C) Mit der „Sulf2“ Kontroll-PCR (Primer Sulf2-1491-F und Sulf1-1775-R) sind (endogene) *Sulf2*-Transkripte in allen drei Proben nachweisbar (Pfeilspitze oberes Gelfoto). Mit der tg-Sulf2-PCR (Primer RT-Col2-Ex1-F und RT-Sulf2-126-R) ist bei beiden Linien Col2a1-*Sulf2*^{tg79} und Col2a1-*Sulf2*^{tg80} überexprimierte *Sulf2*-Transkripte nachweisbar (Pfeilspitze unteres Gelfoto). (D-L) *In situ*-Hybridisierung an E14,5 Extremitäten mit *Col2a1* (D), *Sulf1-intern* (E,F,I,J) und *Sulf2-intern* (G,H,K,L) RNA-Sonden. Die Farbreaktion bei transgenen Tieren (I-L) und den darunter abgebildeten zugehörigen Wildtyp-Wurfgeschwistern (D-H) wurde gleichzeitig abgestoppt. Ähnlich zur *Col2a1*-Expression in proliferierenden Chondrozyten (D) findet sich bei Col2a1-*Sulf2*^{tg79} (K) und Col2a1-*Sulf2*^{tg80} (L) eine deutliche *Sulf2* Expressionsdomäne in dieser Zellpopulation. Bei Wildtyp-Embryonen ist eine schwächere Expression der endogenen *Sulf2*, in proliferierenden Chondrozyten des Humerus zu erkennen (K,L). Für Col2a1-*Sulf1*^{tg199} (I) und Col2a1-*Sulf1*^{tg208} (J) konnte keine Überexpression von *Sulf1* in proliferierenden Chondrozyten detektiert werden.

3.5.3. Identifizierung der chromosomalen tg199-Integrationsstelle

Obwohl von den transgenen Mäusen der Linie Col2a1-Sulf1^{tg199} die Sulfatase 1 nicht überexprimiert wird (Abschnitt 3.5.2.), zeigen sie paradoxerweise zwei Skelettveränderungen mit hoher Penetranz: (1.) eine verzögerte Knochenentwicklung und (2.) eine homeotische Transformation des Lendenwirbels L1 (Abschnitt 3.5.1.). Es konnte daher vermutet werden, dass der Skelettphänotyp durch die Position der tg199-Integrationsstelle im Mausgenom hervorgerufen wird. Möglicherweise kommt es dadurch zur Inaktivierung eines für die Knochenentwicklung bedeutsamen Genes. Es wurde deshalb versucht, die Integrationsstelle der Col2a1-Sulf1-Kassette im Mausgenom von tg199-Tieren, mittels inverser PCR (iPCR), zu ermitteln. Mit dieser Methode werden, ausgehend von einer bekannten DNA-Sequenz (Col2a1-Sulf1 Konstrukt) benachbarte unbekannte DNA-Sequenzen (genomische DNA) isoliert und können anschließend sequenziert werden (Methodenteil 2.5.).

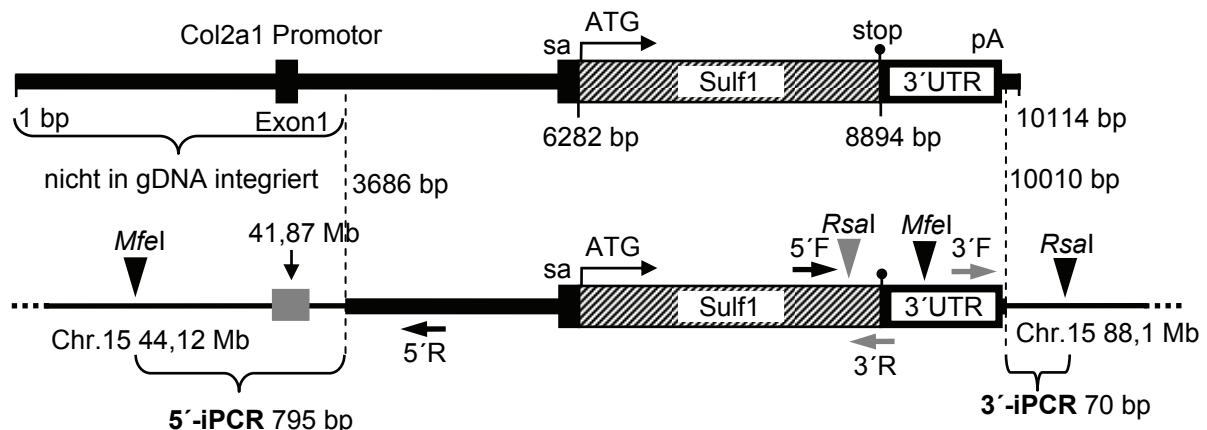


Abb. 3.5.5: Col2-Sulf1^{tg199} - Ergebnisse der 3'- und 5'- inversen PCR.

Schema des 10114 bp linearisierten Col2a1-Sulf1 Konstrukts (oberes Bild). Das im Genom der transgenen Col2-Sulf1^{tg199} Tier integrierte Konstrukt umfasst nur noch die Basen 3686-10010 bp, der Transkriptionsstart in Exon1 fehlt (unteres Bild). Für die 3'-iPCR wurde die Restriktionsendonuklease *RsaI* und die Primer 3'F und 3'R verwendet (graue Pfeile). Für die 5'-iPCR wurde die Endonuklease *MfeI* und die Primer 5'F und 5'R verwendet (schwarze Pfeile).

Um eine Amplifikation der endogen Col2a1 bzw. Sulf1 Genloci bei der iPCR zu vermeiden, wurde ein Primer in den Col2a1- und der zweite in den Sulf1-Abschnitt des Konstruktes gelegt (Abb. 3.5.5). Insgesamt wurden drei verschiedene Regionen mittels iPCR aus dem Genom der transgenen Col2a1-Sulf1^{tg199} Tiere amplifiziert, die als 5'-iPCR, 3'-iPCR und 42Mb-iPCR bezeichnet werden (Methodenteil 2.5.; DNA-Sequenzen im Anhang 8.4.3.).

Bei der 5'-iPCR wurden 795 bp von *MfeI*-geschnittener gDNA amplifiziert (Abb. 3.5.6; Anhang 8.4.3.2.). Zur Kontrolle wurde dieser Bereich direkt aus der

ungeschnittenen Col2-Sulf1^{tg199} gDNA mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Beide DNA-Sequenzen sind identisch. Lediglich zur NCBI-Genomsequenz (C57BL6 Mausstamm) bestehen einige Unterschiede, die aber durch den unterschiedlichen Mausstamm (FVB/N) der Col2-Sulf1^{tg199} Tiere erklärbar sind. Trotzdem konnten die DNA-Sequenzen eindeutig zu zwei Abschnitten auf Chromosom 15 zugeordnet werden. Der Bereich 1 - 583 bp stimmt mit Position 44,12 Mb überein und der Bereich 578 - 632 bp mit Position 41,87 Mb. Der zuletzt genannte nur 55 bp umfassende Bereich innerhalb der 5'-iPCR DNA-Sequenz ist jedoch im Vergleich zur NCBI-Genomsequenz komplementär und invertiert (graues Kästchen, Abb. 3.5.5).

Des Weiteren ergab die Sequenzierung des 5'-iPCR-Produktes, dass der im Genom integrierte Col2a1-Promotor am 5'-Ende trunkiert ist (bis 3686 bp). Da somit auch die Transkriptions-Initiationssequenz des Col2a1-Exon1 nicht vorhanden ist, liefert dieser Befund gleichzeitig eine Erklärung für die fehlende *Sulf1*-Überexpression bei den Col2-Sulf1^{tg199} Tieren (RT-PCR und ISH, Abschnitt 3.5.2.).

Bei der 3'-iPCR konnte aus *RsaI*-geschnittener gDNA eine 70 bp DNA-Sequenz amplifiziert werden, welche sich im *Mus musculus* NCBI-Referenzgenom auf Chromosom 15 bei Position 88,10 Mb wieder findet (Abb. 3.5.5; Anhang 8.4.3.1.).

Da die beiden tg199-flankierenden gDNA-Sequenzen (5'- und 3'-iPCR) im NCBI-Referenz-Mausgenom über 46 Mb auseinander liegen (entspricht circa 45% der Gesamtlänge von Chromosoms 15), erscheint eine einfache Integration des Col2a1-Sulf1-Konstruktes unwahrscheinlich. Außerdem befinden sich zwischen der Col2a1-Sulf1-DNA-Sequenz und den flankierenden gDNA-Sequenzen (am 5'- und 3'-Ende) komplementäre und invertierte DNA-Abschnitte. Diese lassen einen komplizierten Ablauf der tg199-Integration vermuten. Von besonderem Interesse ist eine Sequenz von 55 bp (graues Kästchen in Abb. 3.5.5. & 3.5.6.), welche nicht zur flankierenden gDNA-Sequenz gehört, sondern mit einer davon 2,25 Mb entfernten gDNA-Sequenz identisch ist. Um herauszufinden, ob das Chromosom 15 an dieser Stelle (bei Position 41,87 Mb) ebenfalls durch die tg199-Insertion verändert ist, wurde eine dritte inverse PCR durchgeführt (Abb. 3.5.6, Anhang 8.4.3.3.). Mit dieser als 42Mb-iPCR bezeichneten inversen PCR, konnte aus *HindIII*-geschnittener Col2-Sulf1^{tg199} gDNA eine circa 2 kb große Bande amplifiziert werden. Die Sequenzierung ergab (1.) das der 55 bp Bereich nicht mehr bei 41,87 Mb auf Chromosom 15 vorhanden ist und (2.) dass sich stattdessen die gDNA-Sequenz von Chromosom 15 Position 88,06 Mb anschließt. Dieser Bereich liegt nur circa 40 kb von dem in der 3'-iPCR ermittelten Bereich bei 88,10 Mb entfernt.

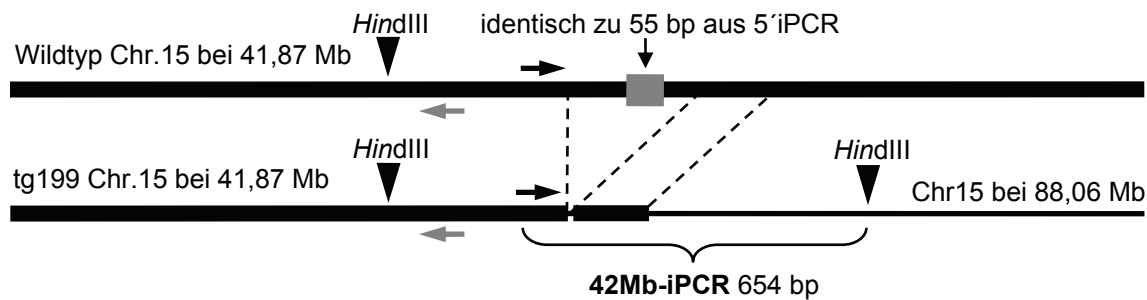


Abb. 3.5.6: Col2-Sulf1^{tg199} - Ergebnis der 42Mb inversen PCR.

Schema der dritten inversen PCR (42Mb-iPCR). Im tg199-Genom grenzen zwei Bereiche (41,87 Mb und 88,06 Mb) von Chromosom 15 aneinander. Ein Teilbereich, welcher eine identische Sequenz wie der 55 bp Bereich (graues Viereck) der 5'-iPCR enthält, ist in diesem Bruchpunkt nicht mehr vorhanden.

Anhand der drei inversen PCR-Ergebnisse lässt sich ein Modell für die Lage der tg199-Insertion aufstellen (Abb 3.5.7). Demnach inserierte das Col2a1-Sulf1-Konstrukt zwischen den Positionen 41,87 und 44,25 Mb auf Chromosom 15. Dabei kam es zur Deletion des dazwischenliegenden Bereiches und zur Insertion eines vermutlich 40 kb großen Fragmentes von Chromosom 15 bei Position 88,1 Mb.

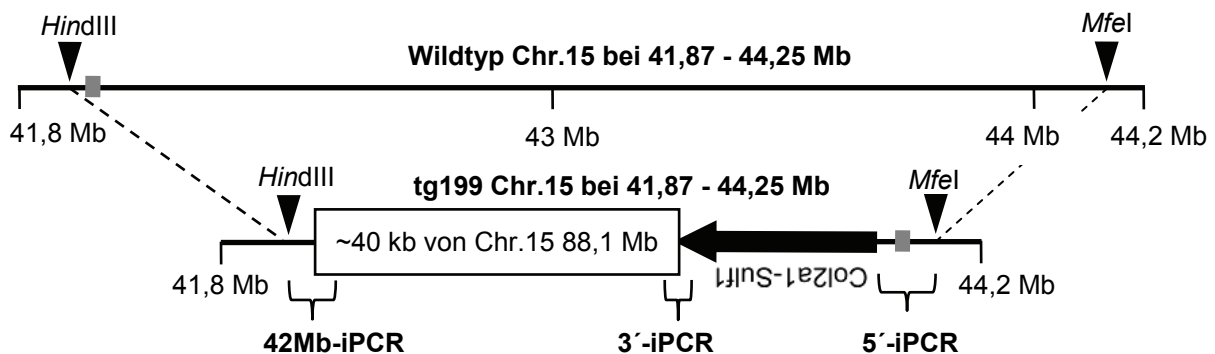


Abb. 3.5.7: Col2-Sulf1^{tg199} - Modell der Transgen-Insertion auf Chromosom 15.

Schema eines normalen Chromosoms 15 im Bereich 41,87 bis 44,25 Mb (oben). Nicht maßstabsgerechtes Modell für die tg199 Insertion auf Chromosom 15 (unten). Ein circa 2,25 Mb umfassender Bereich von Chromosom 15 (zwischen Position 41,8 und 44,2) ist deletiert und ein circa 40 kb großer Bereich (im Wildtyp-Chromosom 15 bei 88,1 Mb) ist bei den Col2-Sulf1^{tg199} Tieren dupliziert.

3.5.4. Col2a1-Sulf1^{tg199} trägt eine 2,25 Mb Deletion auf Chromosom 15

Das für die tg199-Integration aufgestellte Modell einer 2,25 Mb Deletion und einer 40 kb Duplikation auf Chromosom 15 wurde durch quantitative Messung des genomischen DNA-Gehaltes überprüft. Hierzu wurden für ausgewählte Bereiche neben und innerhalb der Deletion geeignete Primerpaare für eine quantitative PCR-Analyse ausgewählt (Abb. 3.5.8, Tab. 2.5).

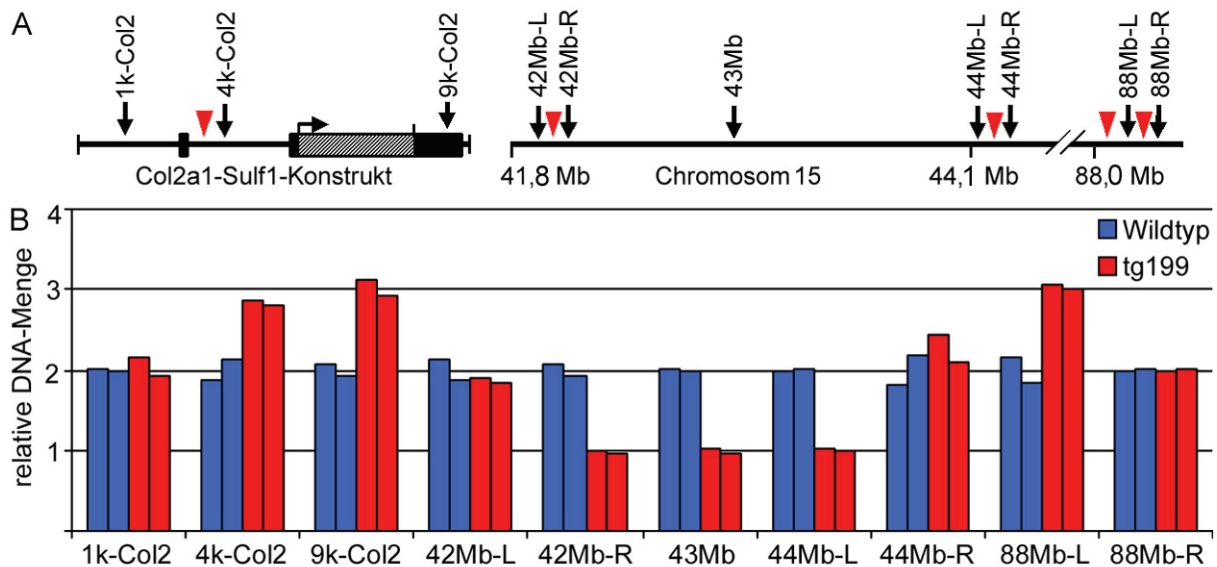


Abb. 3.5.8: Quantitative Bestimmung der gDNA-Menge bei tg199-Tieren.

(A) Die Lage der verwendeten Primerpaare (Pfeile) ist im Schema angegeben, Col2-Sulf1-Konstrukt (links) und Wildtyp-Chromosom 15 (rechts). Die durch iPCR ermittelten Bruchpunkte sind durch rote Pfeilspitzen markiert. **(B)** Ergebnisse der quantitativen PCR. Genomische DNA wurde von zwei Wildtyp- (blaue Balken) und zwei tg199 Embryonen (rote Balken) isoliert und für 10 gDNA-Bereiche wurde die DNA-Menge im Verhältnis zu den Wildtyp-Tieren quantitativ bestimmt. Unterschiede in der gDNA-Ausgangsmenge zwischen einzelnen Tieren wurde durch Abgleich mit der 88Mb-R PCR ausgeglichen. In der Col2a1-Sequenz des Vektors wurden drei Bereiche bei circa 1 kb, 4 kb und 9 kb untersucht. Da der Bereich 1k-Col2 im tg199 Vektor nicht mehr enthalten ist, wird nur der unveränderte endogene Col2 Lokus bestimmt. Im Gegensatz dazu ist die 4k-Col2 und 9k-Col2 Region in der tg199 Mutante enthalten. Der Zuwachs um 50% in der tg199 Probe entspricht einer zusätzlichen Col2-Kopie, da im Wildtyp 2 Allele Col2 vorhanden sind. Die beiden Primer außerhalb der 2,25 Mb Deletion 42Mb-L und 44Mb-R zeigen keinen Unterschied zu den Wildtyp-Tieren, aber die drei Regionen (42Mb-R, 43Mb, 44Mb-L) innerhalb des deletierten Bereichs sind bei tg199 Tieren auf die halbe gDNA-Menge reduziert, d.h. ein Allel fehlt. Das Primerpaar 88Mb-L liegt innerhalb der 40 kb duplizierten Sequenz und ist in tg199 Tieren 50% erhöht. Dies entspricht einer zusätzlichen Kopie.

Die quantitative PCR mit genomischer DNA bestätigt, dass der Col2a1-Promotor des Col2a1-Sulf1-Konstruktes nicht im Genom der transgenen Tiere enthalten ist (Abb. 3.5.8B, gleiche Balkenhöhe 1k-Col2). Der verbleibende Teil des Col2a1-Sulf1-Konstruktes integrierte mit einer einzigen Kopie im Genom der heterozygoten Col2-Sulf1^{tg199} Tiere. Erkennbar an der um 50% erhöhten DNA-Menge bei tg199-Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren (Abb. 3.5.8, 4k-Col2 und 9k-Col2). Ebenfalls um 50% erhöht ist die DNA-Menge aus dem Bereich der 40 kb Insertion von Chromosom 15 Position 88,1 Mb benachbart zum 3'Ende Col2a1-Sulf1 Vektors. Die 2,25 Mb Deletion auf Chromosom 15 bei zwischen 41,87 bis 44,12 Mb konnte mit 3 Primerpaaren (42Mb-R, 43Mb und 44Mb-L) bestätigt werden. Die nur wenige kb

außerhalb der durch die iPCR ermittelten Bruchpunkte liegenden Kontroll-PCRs 42Mb-L und 44Mb-R sind wie erwartet unverändert. Da tg199 Tiere heterozygot für die Insertion sind bedeutet eine um 50% verminderte DNA-Menge, dass ein Allel dieses chromosomalen Bereichs nicht vorhanden ist und ein um 50% erhöhter Messwert, dass eine zusätzliche Kopie vorhanden ist.

3.5.5. Expressionsmuster der auf Chromosom 15 deletierten Gene

Ein Vergleich mit der NCBI-Genomdatenbank zeigt, dass sich in den 40 kb duplizierten Bereich von Chromosom 15 zwischen 88,06 Mb und 88,10 Mb kein annotiertes Gen befindet. Jedoch trägt der 2,25 Mb umfassende deletierte Bereich auf Chromosom 15 zwischen 41,87 und 44,12 Mb sechs annotierte Gene: *Angpt1*, *Eif3s6*, *Rspo2*, *Ttc35*, *Tmem74* und *Trhr* (Abb. 3.5.9A). Eines oder auch mehrere dieser Gene kommen daher als Ursache der beiden Skelettveränderungen bei transgenen *Col2a1-Sulf1*^{tg199} Mäusen in Betracht (Abschnitt 3.5.1.). Anhand des Phänotypes lässt sich vermuten, dass (1.) die verzögerte Knochen-Differenzierung durch ein Gen verursacht wird, welches in Chondrozyten oder im Knochen exprimiert wird. (2.) Das ein Gen, welches die homeotische Transformation der Lendenwirbel verursacht, während der frühen Somitenbildung exprimiert werden sollte.

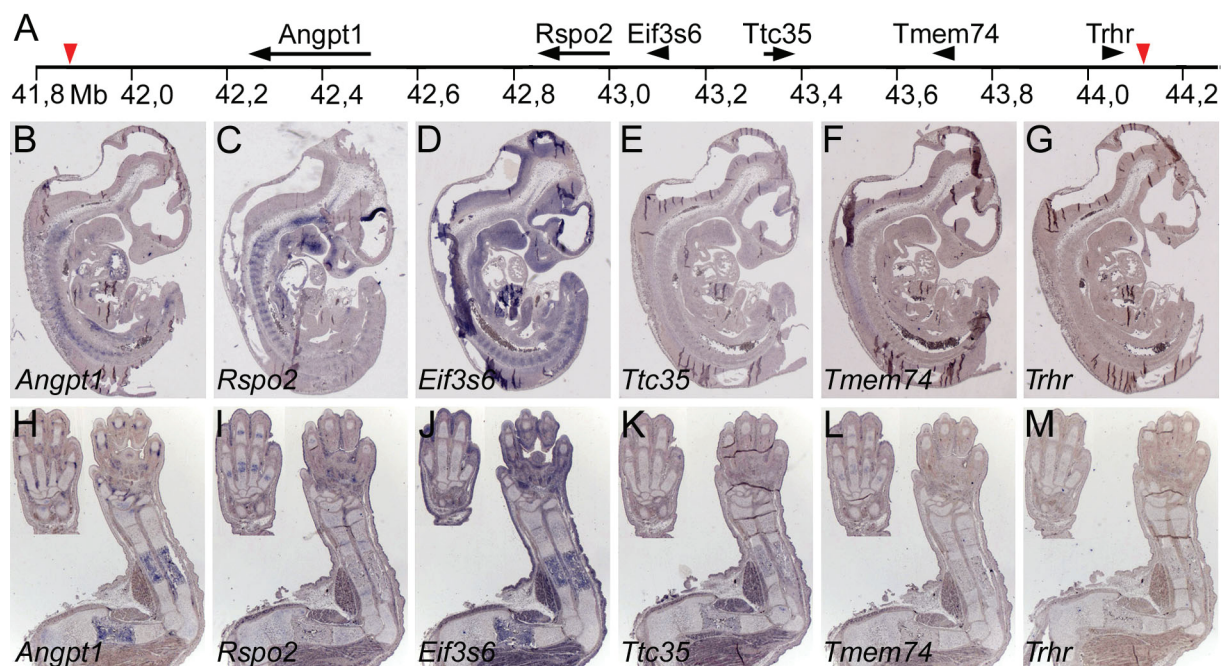


Abb. 3.5.9: Expressionsmuster der 6 Kandidatengene am Wildtyp-Embryo.

(A) Schematische Darstellung der Anordnung der sechs annotierten Gene auf dem *Mus musculus* Chromosom 15 zwischen 41,87 und 44,12 Mb. Die Bruchpunkte der tg199 Deletion sind durch rote Pfeilspitzen gekennzeichnet. (B-M) *In situ*-Hybridisierung der 6 Kandidatengene an E11,5 (B-G) und E16,5 (H-M) Gewebeschnitten von C57BL6 Wildtyp-Embryonen.

Um diese Vermutungen zu überprüfen, wurden die Expressionsmuster der sechs Kandidatengene an Schnittserien von E11,5 Embryonen (Abb. 3.5.9B-G) und E16,5 Extremitäten (Abb. 3.5.9H-M) von Wildtyp-Tieren mittels ISH bestimmt. Für 3 Gene konnte eine Expression in den Somiten bei E11,5 Embryonen nachgewiesen werden, *Angpt1* (Angiopoietin 1), *Eif3s6* (Elongationsinitiationsfaktor 3 subunit 6) und *Rspo2* (R-Spondin 2). *Tmem74* (Transmembranprotein 74) ist zu diesem Zeitpunkt schwach im Rückenmark exprimiert. Für *Ttc35* (Tetratricopeptide repeat domain 35) und *Trhr* (Thyrotropin-releasing hormone receptor) konnten am Tag E11,5 und E16,5 keine Expressionsdomänen detektiert werden. Am Tag E16,5 sind *Angpt1* und *Eif3s6* im neu gebildeten Knochen exprimiert und *Rspo2* und *Tmem74* in hypertrophen Chondrozyten (Abb. 3.5.9H-J). Anhand dieser Expressionsdaten erscheinen *Angpt1*, *Eif3s6*, *Rspo2* und/oder *Tmem74* als wahrscheinlichste Kandidaten, um die Skelettveränderungen der *Col2a1-Sulf1*^{tg199} Tiere zu erklären.

3.6. Arsl-Überexpression im Hühnerembryo

In Abschnitt 3.1.2. wurde neben Sulf1 und Sulf2 die Arylsulfatase I (Arsl), als in Chondrozyten exprimierte Sulfatase identifiziert. Für eine erste funktionelle Untersuchung sollte die *Mus musculus* Arsl mittels RCAS-BPA Virus in der rechten Flügelanlage von 4,5 Tage alten Hühnerembryonen überexprimiert werden (Methodenteil 2.1.7.2. und 2.8.). Die Knochen der Flügelanlage wurden nach weiteren 5,5 Tagen im Brutschrank untersucht. Dabei diente der linke nicht infizierte Flügel als Referenz für den rechten mit RCAS-Arsl infizierten Flügel vom selben Embryo. Mittels *in situ*-Hybridisierung konnte *Arsl*-Transkripte in der rechten Flügelanlage detektiert werden (blau angefärbt, Abb. 3.6.1.B,C). Jedoch werden nicht alle Chondrozyten der Flügelanlage vom RCAS-Virus infiziert. Es konnten keine Unterschiede in der Zellmorphologie von *Arsl* exprimierenden und nicht infizierten Zellen ermittelt werden (Abb. 3.6.1C). Die morphologische Untersuchung der Alcianblau angefärbten Skelettpräparationen, lieferte keine Hinweise auf Fehlbildungen an Knochen oder Gelenken.

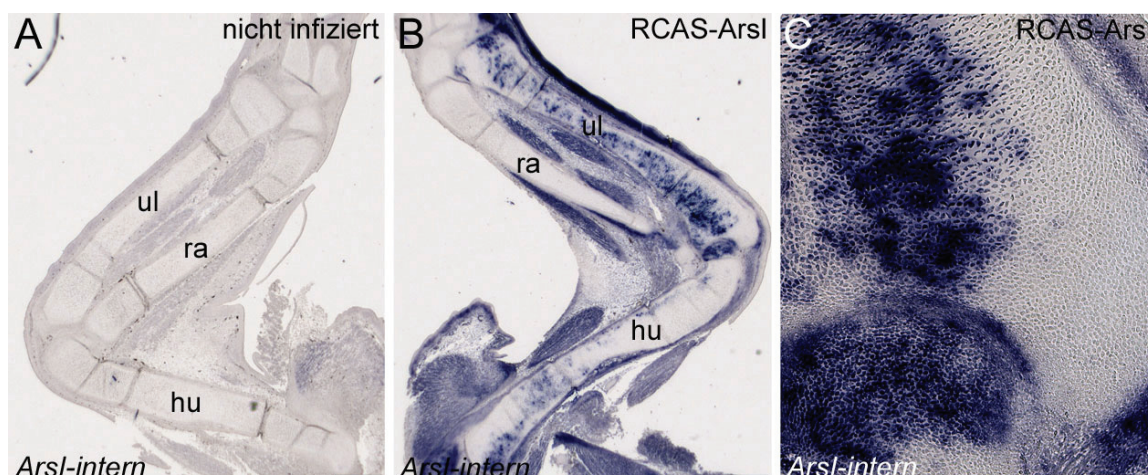


Abb. 3.6.1: RCAS-ArsI infizierte Flügelanlage eines Hühner-Embryos.

Längsschnitt durch Humerus (hu), Radius (ra) und Ulna (ul) eines 10 Tage alten Hühner-Embryos. In situ-Hybridisierung mit der *Arsl-intern*-Sonde (#84) im nicht infizierten linken Flügel (A) und mit RCAS-ArsI infizierten rechten Flügel (B,C) vom selben Tier. (C) Vergrößerung des Ellbogengelenks aus (B). Arsl exprimierende Zellen erscheinen blau gefärbt. Maßstabsbalken in A,B = 500 µm, in C = 200 µm.

Jedoch wurde bei der Längenmessung von Humerus, Radius und Ulna bei 2 von 11 Embryonen eine Verkürzung auf 91-94% im Vergleich zum nicht infizierten linken Flügel festgestellt (Tabelle 3.6.1.).

Tabelle 3.6.1: Längenmessung der RCAS-ArsI infizierten Flügelanlagen.

	Humeruslänge (%)	Radiuslänge (%)	Ulnalänge (%)
Embryo # 1	98	98	100
Embryo # 2	98	104	100
Embryo # 3	101	102	101
Embryo # 4	97	98	99
Embryo # 5	91	94	93
Embryo # 6	100	100	100
Embryo # 7	97	100	99
Embryo # 8	100	103	99
Embryo # 9	92	92	92
Embryo # 10	100	98	100
Embryo # 11	101	102	100

Die Länge von Humerus, Radius und Ulna wurde an Alcianblau gefärbten Skeletten von 10 Tage alten Hühnerembryonen gemessen. Die Knochenlänge vom nicht infizierten linken Flügel diente als Referenz und die Länge des RCAS-ArsI infizierten rechten Flügels vom selben Tier ist in Prozent angegeben. Bei zwei Tieren (#5, #9) sind alle drei vermessenen Knochen des RCAS-ArsI infizierten Flügels verkürzt.

Diese erste Studie zur Funktion der Arsl lieferte keine eindeutigen Rückschlüsse auf eine mögliche Rolle, während der endochondrale Ossifikation. Es sind daher Untersuchungen an Maus Deletionsmutanten nötig, um die Funktion dieser in hypertrophen Chondrozyten exprimierten Sulfatase zu entschlüsseln.

4. Diskussion

4.1. Die Sulfatase-Genfamilie

Die Bedeutung der Sulfatasen für den menschlichen Organismus lässt sich gut daran erkennen, dass mindestens 8 monogenetische Erbkrankheiten durch den Ausfall einzelner Sulfatasen hervorgerufen werden (Tab. 1.1; Diez-Roux & Ballabio, 2005). Diese acht Sulfatasen: *ArsA*, *ArsB*, *ArsC*, *Galns*, *Gns*, *Ids* und *Sgsh*, sind hinsichtlich ihrer biologischen Funktion sehr gut untersucht. In den letzten Jahren riefen zwei weitere Sulfatasen: *Sulf1* und *Sulf2* ein breites Forschungsinteresse hervor. Beide Enzyme spielen eine Rolle bei der Regulation verschiedener Signalwege während der embryonalen Musterbildung sowie der Tumorgenese (Lamanna et al., 2006). Insgesamt sind im Genom des Menschen 17 und dem der Maus 14 Sulfatase-Gene enthalten (Sardiello et al., 2005). Vier dieser Sulfatasen: *ArsG*, *ArsI*, *ArsJ* und *ArsK* der Maus sind allerdings kaum untersucht.

4.1.1. Gen-Expression der Sulfatasen im Mäuse-Embryo

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Gen-Expressionsmuster der 14 Sulfatasen zu verschiedenen Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung der Maus untersucht. Insgesamt konnten mRNA-Transkripte von 9 verschiedenen Sulfatasen mittels ISH nachgewiesen werden (Ergebnisteil 3.1.1.). Durch die Verwendung von benachbarten Gewebeschnitten für die verschiedenen ISH-Sonden, konnten überlappende bzw. benachbarte Expressionsdomänen der einzelnen Sulfatasen ermittelt werden. In einigen Geweben waren besonders viele Sulfatasen exprimiert: Knorpel/Knochen (*ArsB*, *ArsI*, *ArsJ*, *Gns*, *Sulf1* und *Sulf2*), Augenanlage (*ArsI*, *Galns*, *Gns*, *Ids*, *Sulf1*, *Sulf2*) und Choroidplexus mit angrenzendem Gewebe (*ArsI*, *ArsG*, *Sulf1* und *Sulf2*) (Abb. 3.1.3-5).

Besonders interessant waren die Expressionsdaten für die bisher kaum untersuchten Sulfatasen: *ArsG*, *ArsI* und *ArsJ*. Wie in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden konnte, wird die *ArsG* spezifisch im Choroidplexus des Ventrikelsystems exprimiert. Bisher wurde die *ArsG*-Expression in zwei Arbeiten untersucht. In der ersten Studie wird *ArsG* als ubiquitär und schwach exprimiert beschrieben, jedoch werden die zugehörigen ISH-Bilder der E12,5 und E14,5 Embryonen nicht gezeigt (Ferrante et al., 2002). Möglicherweise war bei den verwendeten Gewebeschnitten der Choroidplexus nicht enthalten. Bei der zweiten Studie wurden mittels semiquantitativer RT-PCR gewebespezifische Unterschiede in der *ArsG*-Expression

beim erwachsenen Menschen festgestellt, z.B. wurden Transkripte in Leber, Niere und Bauchspeicheldrüse, jedoch nicht in Lunge und Gehirn nachgewiesen (Frese et al., 2008). Für *ArsI* und *ArsJ* wurden bisher noch keine Gen-Expressionsdaten publiziert. In dieser Arbeit konnte *ArsI* benachbart zum Choroidplexus, im Linsenepithel des embryonalen Auges und in hypertrophen Chondrozyten detektiert werden. Außerdem wird *ArsI* am Tag E14,5 in der äußeren Schicht der proliferierenden Chondrozyten, jedoch nicht im Gelenkspalt des Ellbogengelenks exprimiert. Vergleicht man die *ArsI*- und *Sulf2*-Expressionsdomänen zu diesem Zeitpunkt, so lassen sich zwei Zellpopulationen innerhalb der proliferierenden Chondrozyten unterscheiden: im inneren *Sulf2*-positive Zellen, welche von *ArsI*-positiven Zellen umgeben sind. Eine ähnliche Abgrenzung beider Transkripte ist in den Anlagen von Basisphenoid, Felsenbein und Meckelschen Knorpel, in der Kopfreion von E14,5 Embryonen zu erkennen (Abb. 3.1.3). Zum Zeitpunkt E16,5 wird *ArsI* in hypertrophen Chondrozyten und *Sulf2* in proliferierenden Chondrozyten exprimiert. Für zukünftige Untersuchungen der Chondrozyten-Differenzierung bei anderen Mausmutanten könnten daher *ArsI* und *Sulf2* als weitere molekulare Markergene verwendet werden. Die dritte unbekannte Sulfatase *ArsJ* wird zum Zeitpunkt E14,5 in Chondrozyten des Felsenbeins, Meckelschen Knorpels und Ellbogengelenk schwach exprimiert. Am Tag E16,5 konnte *ArsJ* nicht mehr detektiert werden.

Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Gen-Expressionsanalyse lag in der Darstellung möglichst aller im embryonalen Knorpel- und Knochengewebe exprimierten Sulfatasen. Neben den eben genannten *ArsI* und *ArsJ* sind in den Chondrozyten auch *Sulf1* und *Sulf2* exprimiert. Die Expressionsdaten beider Sulfatasen werden im Zusammenhang mit dem Skelettphänotyp der Mausmutanten in Abschnitt (4.1.2) besprochen. Im neu gebildeten Knochen werden zum Zeitpunkt E16,5 *ArsB* und *Gns*, wahrscheinlich von Osteoklasten exprimiert (Ergebnisteil 3.1.2.). In der Literatur sind keine Expressionsdaten für diese Sulfatasen zu finden.

Für die beiden nah verwandten Sulfatasen *ArsC* und *ArsE* (Ergebnisteil 3.1.) konnten in dieser Arbeit keine Expressionsdomänen detektiert werden. Jedoch finden sich in der Literatur Hinweise dafür, dass beide Gene embryonal exprimiert werden. Für *ArsC* (Synonym: Sts, Steroid-Sulfatase) wurde in der Studie von Compagnone et al. (1997) eine Expressionsdomäne in den Knorpelanlagen von E14,5 und E16,5 Mäuse-Embryonen festgestellt. Möglicherweise sind die Unterschiede beider Arbeiten mit der Art der Gewebefixierung (PFA/Paraffin bzw. kryokonserviert) oder

der verwendeten ISH-Sonde zu erklären. Versuche eine ähnliche ArsC-ISH-Sonde, wie die von Compagnone et al. (1997) verwendete, zu klonieren blieben ohne Erfolg. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete ArsE ISH-Sonde lieferte kein spezifisches Hybridisierungssignal, sondern färbte den gesamten Gewebeschnitt nahezu durchgängig an. Da nur Teilbereiche der ArsE cDNA-Sequenz der Maus bekannt sind, konnte keine andere ISH-Sonde generiert werden. Alle Versuche die vollständige ArsE cDNA-Sequenz der Maus zu klonieren blieben erfolglos. Für die cARS (ArsE Ortholog vom Huhn, *Gallus gallus*) wurden bei Hühner-Embryonen (E3,5 – E5,5) gewebespezifische Expressionsdomänen beispielsweise im Neuroepithelium und den Extremitätenanlagen nachgewiesen (Ferrante et al., 2004).

In dieser Arbeit konnten neben *ArsC* drei weitere Sulfatasen: *ArsA*, *ArsK* und *Sgsh* nicht detektiert werden. Dies könnte zum einen tatsächlich bedeuten, dass diese Gene in den untersuchten Altersstadien nicht exprimiert werden. Zum anderen könnte die verwendete Detektionsmethode (nicht-radioaktive ISH) nicht sensitiv genug sein, um schwach exprimierte Sulfatase-Transkripte nachzuweisen. Deshalb sollten für zukünftige Untersuchungen dieser Gene, weitere ISH-Sonden in Kombination mit der sensitiveren, radioaktiven ISH getestet werden. Möglicherweise könnte durch die Verwendung von kryokonservierten Geweben anstelle von PFA/Paraffin-fixierten Gewebeproben die Detektion mit einzelnen ISH-Sonden verbessert werden. Außerdem könnten andere Nachweismethoden, wie quantitative RT-PCR oder radioaktiver Northern Blot für ein erstes Screening verwendet werden. Wie diese vergleichende Expressionsstudie der Sulfatase-Genfamilie (sowie Literaturdaten) zeigen, sind im embryonalen Knorpel- und Knochengewebe mindestens 7 Sulfatasen exprimiert.

4.1.2. Gen-Expression von *Sulf1* und *Sulf2* im embryonalen Skelett

Sulf1 und *Sulf2* werden teilweise in überlappenden Domänen im Knorpel- und Knochengewebe exprimiert. Zum Zeitpunkt des Auswachsens der Extremitäten- und Kiefer-Anlagen ist *Sulf1*, nicht aber *Sulf2*, im AER und Ektoderm des Kieferbogens exprimiert. Hingegen werden beide Gene überlappend im Mesoderm der Extremitäten- und Kiefer-Anlagen exprimiert. Obwohl beide Sulfatasen in den Extremitäten exprimiert werden, konnten bei den *Sulf1*;*Sulf2* Doppelmutanten keine Veränderungen an den Extremitäten (abgesehen von der Größenreduktion) festgestellt werden. Allerdings sind bei einigen wenigen Doppelmutanten die linken

und rechten Mandibelhälften miteinander verwachsen. Dies beruht wahrscheinlich auf Störungen während des Auswachsens der ersten Kieferbogen-Anlage. Dieser Phänotyp wird durch das Fehlen eines Shh-Allels im $Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt}$ defizienten Hintergrund verstärkt, wodurch in seltenen Fällen der Unterkiefer vollständig fehlt (Ergebnisteil 3.4.).

Beide Sulfatasen sind während der endochondralen Knochenbildung in den Gelenken exprimiert (Ohto et al., 2002; Nagamine et al., 2005; Zhao et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde die dynamische Gelenksexpression während der Embryonalentwicklung vertiefend charakterisiert. Zwischen Tag E12,5 und E14,5 sind beide Gene in allen untersuchten Gelenken co-exprimiert. Zum Zeitpunkt E16,5 ist *Sulf1* kaum noch in den Gelenken nachweisbar, während *Sulf2* weiterhin stark exprimiert wird. Obwohl die starke Gelenksexpression eine Beteiligung an der Bildung bzw. Aufrechterhaltung der Gelenke vermuten lässt, findet sich in *Sulf1*;*Sulf2* Mutanten keine Fehlbildungen in den Gelenken der Extremitäten. Jedoch treten im Sternum und im Schwanz Verwachsungen von benachbarten Skelettelementen (Sternebrae bzw. Schwanzwirbeln) auf. Dies lässt auf einen unterschiedlichen Einfluss der Sulfatasen auf verschiedene Gelenke schließen.

Ähnlich wie von Lum et al. (2007) beschrieben, konnte eine *Sulf2*-Expressionsdomäne in den proliferierenden Chondrozyten detektiert werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass *Sulf1* nicht aber *Sulf2* in hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird und dass im neu gebildeten Knochen beide Sulfatasen exprimiert sind. Alles in allem unterstützen die Expressionsdaten von *Sulf1* und *Sulf2* eine mögliche Beteiligung der HS-6-O-Sulfatierung während der endochondralen Verknöcherung.

4.1.3. Bedeutung von Sulfatasen für die Skelettentwicklung

Wie in der Einleitung (Abschnitt 1.5.) beschrieben, müssen alle eukaryontischen Sulfatasen posttranslational modifiziert werden, um in ein katalytisch aktives Enzym umgewandelt zu werden. Verantwortlich für diese Modifikation ist das Sumf1-Genprodukt (Cosma et al., 2003; Dierks et al., 2003). Kürzlich wurde der Phänotyp von Sumf1^{-/-} knock-out Mäusen publiziert, der unter anderem durch einen stark ausgeprägten Skelettphänotyp gekennzeichnet ist (Settembre et al., 2007, 2008a). Da bei Sumf1^{-/-} Tieren alle 14 Sulfatasen der Maus gleichzeitig inaktiviert werden, spiegelt der Sumf1^{-/-} Phänotyp die Bandbreite der bereits bekannten Ausfälle

einzelner Sulfatasen wieder. Gleichzeitig könnten aber auch Phänotypen von bisher kaum untersuchten Sulfatasen (ArsG, Arsl, ArsJ, ArsK) den Phänotyp der Sumf1^{-/-} Tiere beeinflussen. Die Skelettveränderungen der Sumf1^{-/-} Tiere lassen sich auf Störungen zweier Prozesse zurückführen: Inhibierung der Autophagozytose und Aktivierung des FGF-Signalweges (Khatri & Schipani, 2008; Settembre et al., 2008a).

4.1.3.1. Störung der Autophagozytose

Unter dem Begriff Autophagozytose (Autophagy) versteht man den Abbau von zelleigenem Cytoplasma und Organellen zur Bereitstellung von Makromolekülen für die Energiegewinnung. Dieser Vorgang wird von der Zelle aktiviert, um verschiedene Stressbedingungen zu tolerieren (Khatri & Schipani, 2008). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Autophagozytose bei hypertrophen Chondrozyten als Normalzustand anzusehen ist. Vermutlich dient sie als Anpassung auf die geringe Sauerstoffkonzentration und Nährstoffversorgung im avaskulären Knorpelgewebe (Srinivas et al., 2008). Bei Sumf1^{-/-} Mäusen, sowie bei lysosomalen Speicherkrankheiten ist der Abbau von Makromolekülen gestört. Infolgedessen reichern sich Zwischenprodukte im Lysosom an, wodurch es zur Störung des zellulären Stoffwechsels sowie der Autophagozytose kommt (Khatri & Schipani, 2008; Settembre et al., 2008a, 2008b).

Die Mukopolysaccharidosen (MPS) gehören zur Gruppe der lysosomalen Speicherkrankheiten, welche auf einen gestörten enzymatischen Abbau bestimmter Glucosaminoglykane (Mukopolysaccharide) zurückzuführen sind. Sechs Typen von MPS (II, IIIA, IIID, IVA, VI) werden durch den Ausfall einzelner Sulfatasen verursacht (Tab. 1.1). Je nachdem in welchen Geweben diese Sulfatasen (normalerweise) exprimiert werden, zeigen die verschiedenen MPS-Typen klinische Erscheinungsbilder, z.B. im Nervensystem oder im Skelettsystem. Bei Patienten mit einem ArsB-Gendefekt (MPS Typ VI; Maroteaux-Lamy Syndrom) und ArsB defizienten Tiermodellen (Maus, Ratte, Katze) treten schwere Skelettfehlbildungen (*Dysostosis multiplex*), Minderwuchs und degenerative Erkrankungen der Gelenke auf (Yoshida et al., 1993; Abreu et al., 1995; Evers et al., 1996). Des Weiteren sind die Chondrozyten der Wachstumsfuge unregelmäßig angeordnet und im Gelenkknorpel ist die Apoptose-Rate verstärkt (Abreu et al., 1995; Simonaro et al., 2001). Bei Patienten mit Galns-Gendefekten (MPS Typ IVA; Morquio A Syndrom) treten ebenfalls Skelettveränderungen und Minderwuchs auf. Jedoch sind im Galns^{-/-}

Mausmodell dieser Erkrankung keine Skelettfehlbildungen zu beobachten (Tomatsu et al., 2003). Von allen bisher untersuchten Störungen der einzelnen Sulfatasen, zeigen ArsB-Mutanten die stärksten Ähnlichkeiten zum Autophagozytose-Phänotyp der Sumf1^{-/-} Mutanten.

4.1.3.2. Störung des FGF-Signalwegs

Eine zweite Komponente des Sumf1^{-/-} Phänotyps kann auf eine verstärkte Aktivierung des FGF-Signalweges zurückgeführt werden. Neugeborene Sumf1^{-/-} Mutanten zeigen eine verkürzte Länge der Skelettelemente, sowie eine um 20% verminderte Proliferationsrate der Chondrozyten. Durch Kombination eines Fgf18^{+/-} Allels im Sumf1^{-/-} Hintergrund, sind diese beiden Merkmale nicht mehr von Wildtyp-Tieren zu unterscheiden (Settembre et al., 2008a). Sehr gute Kandidaten für diesen Aspekt des Sumf1^{-/-} Phänotyps sind die beiden extrazellulären Sulfatasen, Sulf1 und Sulf2 (siehe Abschnitt 4.2.3.).

4.1.3.3. Andere Störungen der Ossifikation

Zusätzlich zu den zuvor genannten Störungen der Autophagozytose oder des FGF-Signalweges könnten andere (nicht Glucosaminoglykan abbauende) Sulfatasen zu den Skelettveränderungen der Sumf1^{-/-} Tieren beitragen. Ein Kandidat hierfür ist die ArsC (Sts), welche in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten postnataler Ratten exprimiert wird (van der Eerden et al., 2002). Die ArsC wandelt inaktive, sulfatierte Steroidhormonvorstufen in aktive Hormone wie z.B. Östrogen E₁ und E₂ um. In den Chondrozyten könnte ArsC zusammen mit anderen Enzymen des Steroidstoffwechsels an der Regulation des Längenwachstums der Knochen, während der Pubertät beteiligt sein (van der Eerden et al., 2002). Ein weiteres Beispiel ist die *Chondrodysplasia punctata 1*, die durch den Ausfall der ArsE hervorgerufen wird. Das Krankheitsbild ist durch abnormale Calcium-Einlagerungen im Knorpelgewebe gekennzeichnet (Franco et al., 1995).

4.1.3.4. Mögliche Funktion der Arsl und Arsj

Betrachtet man die mittels Sequenzvergleich ermittelten Verwandtschafts-Verhältnisse der im Knorpel und Knochen exprimierten Sulfatasen (Abb. 3.1.1.), so lassen sich zwei Gruppen unterscheiden: (ArsB, Arsl, Arsj) und (Gns, Sulf1, Sulf2).

Eine Gemeinsamkeit der drei letztgenannten Sulfatasen ist die Expressionsdomäne in der Bodenplatte des Rückenmarks. Außerdem besitzen sie die gleiche Substratspezifität für HS-6-O-Sulfatgruppen, wobei die Sulfatgruppen entweder vom nicht-reduziertem Ende (Gns, Exosulfatase) oder innerhalb der HS-Ketten (Sulf1 und Sulf2, Endosulfatase) abgespalten werden (Hanson et al., 2004). Möglicherweise lässt sich ausgehend von *ArsB*, welche die 4-O-Sulfatgruppen der N-Acetyl-Galaktosamin-Reste von Chondroitinsulfat bzw. Dermatansulfat abspaltet (Hanson et al., 2004), auf eine ähnliche Substratspezifität für die nahe verwandten *ArsI* und *ArsJ* schließen. Es wurden jedoch noch keine biochemischen Studien für diese Sulfatasen veröffentlicht. Ein möglicher Einfluss von *ArsI* auf die endochondrale Ossifikation konnte in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden (Ergebnisteil 3.6.). Um die Funktion dieser Sulfatasen zu entschlüsseln, sollten für zukünftige Untersuchungen *ArsI*- bzw. *ArsJ*- Gen-Deletionsmutanten verwendet werden. Die nahe Verwandtschaft zur *ArsB* und die Expression in hypertrophen Chondrozyten lassen *ArsI* als einen guten Kandidaten für den Autophagozytose-Phänotyp der *Sumf1*^{-/-} Mutanten erscheinen.

4.2. Sulf1 und Sulf2 loss of function Mausmutanten

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der vergleichenden Untersuchung von Mausmutanten, welche sich in der Anzahl an Sulf1 und Sulf2 *loss of function* Allelen unterscheiden. Dabei wurden jeweils zwei unterschiedliche Mutationen verwendet: zum einen hypomorphe Genetrap-Allele (Sulf1^{gt} und Sulf2^{gt}) und zum anderen vollständige Null-Allele (Sulf1⁻ und Sulf2⁻).

4.2.1. Skelettphänotyp der Sulf1;Sulf2 Mausmutanten

Bei den Untersuchungen der homozygoten Genetrap-Einzelmutanten konnten, abgesehen von leichten Fehlbildungen an den Wirbeln, keine auffälligen Veränderungen am Skelett festgestellt werden. Bei einem Teil der adulten Sulf1^{gt/gt} Tiere waren ein bis zwei Wirbelbögen dorsal nicht geschlossen. Bei Sulf2^{gt/gt} Embryonen wurde im Vergleich zu Wildtyp-Tieren eine vorzeitige Verknöcherung der Wirbelkörper festgestellt.

Die Kombination beider Sulfatase-Ausfälle in Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Doppelmutanten führte zu weiteren Skelettveränderungen: Verwachsung von Sternebrae im Sternum,

sowie einiger Schwanzwirbel und Fehlbildungen von Basisphenoid (Schädelbasis) und zweitem Halswirbel. Des Weiteren führt die zunehmende Anzahl an mutierten Sulfatase-Allelen zu einer höheren Penetranz und stärkeren Ausprägung der Skelettfehlbildungen. Am stärksten betroffen waren $\text{Sulf1}^{-/-};\text{Sulf2}^{-/-}$ Doppelmutanten. Außerdem führt der Verlust aller vier Sulfatase-Allele, sowohl bei doppelt homozygoten Genetrap- als auch bei Null-Mutanten, zu einem verkleinerten Skelett und einem verringerten Körpergewicht. Bei einigen Tieren wurde eine Fehlstellung der oberen und unteren Schneidezähne festgestellt. Diese könnten die Nahrungsaufnahme erschweren und somit zu einem verringerten Körpergewicht führen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wurde kürzlich bei einer weiteren $\text{Sulf1}^{\text{loxP/loxP}};\text{Sulf2}^{\text{loxP/loxP}}$ Doppelmutante beschrieben. Bei diesen Tieren wurde eine fehlerhafte neuronale Innervation der Speiseröhrenmuskulatur festgestellt, wodurch die Nahrungsaufnahme ebenfalls erschwert wird (Ai et al., 2007). Da jedoch bereits Neugeborene (P0) $\text{Sulf1}^{\text{gt/gt}};\text{Sulf2}^{\text{gt/gt}}$ Doppelmutanten ein geringeres Körpergewicht aufweisen (91%, Tab. 3.3.1.), kann ein, von der postnatalen Nahrungsaufnahme, unabhängiger Effekt von Sulf1 und Sulf2 auf das Körpergewicht postuliert werden.

4.2.2. Weitere Sulf1 und Sulf2 *loss of function* Allele

Neben den in dieser Arbeit untersuchten Allelen: Sulf1^{gt} , Sulf1^{-} , Sulf2^{gt} und Sulf2^{-} , sind in der Literatur weitere Genetrap bzw. gezielt mutierte Allele beschrieben (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Übersicht der Sulf1 und Sulf2 Deletions-Mausmutanten.

Allelname	Art der Mutation	Referenz
Sulf1^{gt}	Genetrap XM190 in Intron 1B inseriert	Ratzka et al., 2008
$\text{Sulf1}^{\text{VICTR48}}$	Genetrap VICTR48 in Intron 2 inseriert	Holst et al., 2007
Sulf1^{-}	Gezielte Mutation Exon 5 (Ersetzt mit Neo-Kasette)	Lamanna et al., 2006
$\text{Sulf1}^{\text{loxP}}$	Gezielte Mutation Exon 5 (Cre-loxP Technik)	Ai et al., 2007
Sulf2^{gt}	Genetrap PST111 in Intron 3 inseriert	Ratzka et al., 2008
$\text{Sulf2}^{\text{VICTR37}}$	Genetrap VICTR37 in Intron 2 inseriert	Holst et al., 2007
$\text{Sulf2}^{\text{XST155}}$	Genetrap XST155 in Intron 5 inseriert	Lum et al., 2007
Sulf2^{-}	Gezielte Mutation Exon 2 (Ersetzt mit Neo-Kasette)	Lamanna et al., 2006
$\text{Sulf2}^{\text{loxP}}$	Gezielte Mutation Exon 3 (Cre-loxP Technik)	Ai et al., 2007

Die in dieser Arbeit untersuchten Allele sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Beim Sulf1^{gt} Allel inserierte der Genetrap-Vektor *upstream* vom zweiten Exon im 2. Intron. Hingegen befindet sich der Genetrap-Vektor beim $\text{Sulf1}^{\text{VICTR48}}$ Allel *downstream* vom Exon 2 im 3. Intron. Es lässt sich vermuten, dass aufgrund des alternativen Spleißens von Exon 2 der $\text{Sulf1}^{\text{VICTR48}}$ Genetrap seltener als der Sulf1^{gt}

Genetrap (beim Spleißen) übersprungen wird. Trotzdem handelt es sich bei beiden Genetraps um hypomorphe Allele, da im homozygoten Zustand noch *Sulf1*-Wildtyp-Transkripte mittels quantitativer RT-PCR nachgewiesen werden konnten (Holst et al., 2007; Ergebnisteil 3.2.3.). Ein direkter Vergleich der Expressionsstärke beider Genetrap-Mausmutanten ist aufgrund der unterschiedlichen verwendeten Gewebe und Zeitpunkte nicht möglich.

Alle drei *Sulf2*-Genetrap-Allele (*Sulf2*^{gt}, *Sulf2*^{VICTR37} und *Sulf2*^{XST155}) führen zur Synthese von katalytisch inaktiven Sulfatase-β-Geo-Fusionsproteinen. Sowohl bei homozygoten *Sulf2*^{gt} als auch *Sulf2*^{VICTR37} Tieren wurden geringe Mengen an *Sulf2*-Wildtyp-Transkripten nachgewiesen (Holst et al., 2007; Ergebnisteil 3.2.3.). Da die homozygoten *Sulf2*^{XST155} Tiere anscheinend keine *Sulf2*-Wildtyp-Transkript bilden (Lum et al., 2007), könnte dies eine Erklärung für den stärkeren Phänotyp (d.h. vereinzelt unterentwickelte Tiere) dieses Allels liefern. Bei den homozygoten *Sulf2*^{gt} bzw. *Sulf2*^{VICTR37} Einzelmутanten wurden keine auffälligen Tiere beobachtet.

Die gezielten Mutationen *Sulf1*^{loxP} und *Sulf2*^{loxP} ermöglichen, in Kombination mit speziellen Cre-Rekombinase-exprimierenden Mäusen, einen gewebespezifischen knock-out der Sulfatase. Bisher wurden bei diesen *Sulf*-Allelen die ubiquitär exprimierte CMV-Cre-Rekombinase eingesetzt, um die Sulfatasen in allen Zellen (auch in der Keimbahn) zu entfernen (Ai et al., 2007). Homozygote Nachkommen dieser Tiere entsprechen daher einer konventionellen Deletions-Mutante, wie die *Sulf1*^{-/-} bzw. *Sulf2*^{-/-} Allele (Lamanna et al., 2006).

Bei allen vier untersuchten Doppelmутanten: *Sulf1*^{gt};*Sulf2*^{gt}, *Sulf1*^{VICTR48};*Sulf2*^{VICTR37}, *Sulf1*^{-/-};*Sulf2*^{-/-} und *Sulf1*^{loxP};*Sulf2*^{loxP} wurde ein vermindertes Körpergewicht und eine reduzierte Körpergröße bei den doppelt homozygoten Tieren festgestellt (Lamanna et al., 2006, 2007; Ai et al., 2007; Holst et al., 2007; Ratzka et al., 2008). Unterschiede bestehen in der Ausprägung der postnatalen Sterblichkeit. Davon am stärksten betroffen sind doppelt homozygote *Sulf1*^{VICTR48};*Sulf2*^{VICTR37} Tiere mit nur 18% Überlebender bis zum Tag P10, gefolgt von *Sulf1*^{loxP/loxP};*Sulf2*^{loxP/loxP} mit 45% (P21) sowie *Sulf1*^{-/-};*Sulf2*^{-/-} mit 46% (P42). Am geringsten betroffen, sind *Sulf1*^{gt/gt};*Sulf2*^{gt/gt} Mutanten mit 89% überlebender Tiere (P21 bis 6. Lebensmonat). Diese Unterschiede könnten zum einen durch die verschiedenen Allele (hypomorph bzw. Null) und zum anderen durch Unterschiede im genetischen Hintergrund (gemischte Anteile von: C57BL6 x 129Sv/Ola bzw. 129SvEv) erklärt werden.

Die doppelt homozygoten *Sulf1*^{VICTR48};*Sulf2*^{VICTR37} Tiere zeigen ähnliche Skelettveränderungen, wie die in dieser Arbeit untersuchten Doppelmутanten:

verkleinerte Skelettgröße, Verschmelzung der Sternebrae, geöffneter Basisphenoid und eine verkürzte Zone der proliferierenden Chondrozyten (Holst et al., 2007). Zusätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit weitere Veränderungen, wie dorsal offene Neuralbögen, beschleunigte Verknöcherung bei Sakral- und Lumbal-Wirbel und calcifizierte Verbindungen zwischen einzelnen Schwanzwirbeln festgestellt. Da bei E18,5 *Sulf1*^{VICTR48};*Sulf2*^{VICTR37} Doppelmutanten die Knochendichte unverändert ist (Holst et al., 2007), scheinen die beobachteten Veränderungen auf einer vorübergehenden Störung der Knochenentwicklung zu beruhen. Um mögliche Veränderungen im ausgereiften Knochen zu entdecken, müssten Knochendichtemessungen bei postnatalen *Sulf1*^{-/-};*Sulf2*^{-/-} Tieren durchgeführt werden.

4.2.3. Einfluss von Heparansulfaten auf die Ossifikation

Wie die bereits klassischen Experimente an *ex vivo* kultiviertem embryonalem Sternumgewebe der Maus zeigen, verwachsen nach dem operativen Entfernen einer Rippe die benachbarten Sternebrae miteinander (Chen, 1953). Eine teilweise Verbindung der Sternebrae lässt sich experimentell durch ein laterales verschieben der Rippen hervorrufen. Daher kann angenommen werden, dass ein oder mehrere von den Rippen sezernierte Faktoren benötigt werden, um entweder die Gelenkbildung zwischen den Sternebrae zu induzieren oder eine Verknöcherung des bestehenden Gelenks zu verhindern (Chen, 1952, 1953; Storm & Kingsley, 1996). *Sulf1* und *Sulf2* sind an den Enden der Rippen und in den unechten Gelenken zwischen den Sternebrae exprimiert (Ergebnisteil 3.1.4.). Es lässt sich daher vermuten, dass beide Sulfatasen, vermittelt über die 6-O-Desulfatierung von HS, die Reichweite solcher Signalmoleküle beeinflussen könnten. Da bei den *Sulf1*;*Sulf2* Doppelmutanten keine Unterschiede in der frühen Sternum-Entwicklung erkennbar waren, scheinen diese Sulfatasen eher eine Bedeutung für die Aufrechterhaltung, als für die Induktion der Sternum-Rippen-Gelenke zu besitzen. Die Untersuchung der Chondrozyten-Differenzierung mittels molekularer Marker zeigte, dass der Bereich der proliferierenden Chondrozyten zwischen benachbarten Sternebrae bei doppelt homozygoten *Sulf1*;*Sulf2* Mutanten verkleinert ist. Dies lässt sich als ein vorzeitiges Einsetzen der hypertrophen Differenzierung deuten. Eine Verkleinerung dieser Zone konnte ebenfalls im Radius von E16,5 Doppelmutanten nachgewiesen werden. Eine beschleunigte Chondrozyten-Differenzierung scheint daher zu einer vorzeitigen

Verknöcherung und in Folge dessen zu Verwachsungen von Sternebrae und Wirbeln zu führen.

Der FGF-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der endochondralen Verknöcherung. Der *FGF-Rezeptor 3 (FGFR3)* ist in proliferierenden Chondrozyten (Minina et al., 2005.) und *FGF18* ist in den umgebenden Zellen des Perichondriums exprimiert (Liu et al., 2002). Durch die Analyse von entsprechenden Mausmutanten wurde gezeigt, dass der Verlust von FGFR3 oder FGF18 zu einem vergrößerten Bereich der proliferierenden Chondrozyten führt (Liu et al., 2002). Im Gegensatz dazu führt eine konstitutive Aktivierung des FGFR3^{ach} (Achondroplasie-Mausmodell) zur Verkleinerung der Zone der proliferierenden Chondrozyten, sowie zum beschleunigten Austausch der hypertrophen Chondrozyten durch mineralisierten Knochen (Naski et al., 1998; Minina et al., 2002). Die Proliferationsrate der Chondrozyten ist bei den FGFR3^{ach} Mutanten zunächst unverändert (Stadium E18,5), ist jedoch bei P20 Tieren auf 60% im Vergleich zu Wildtyp-Tieren reduziert (Naski et al., 1998). Ähnlich dazu ist bei *Sumf1*^{-/-} Embryonen die Proliferationsrate am Tag E14,5 und E16,5 unverändert, ist jedoch bei postnatalen Stadien (P0 und P4) auf 76-79% reduziert (Settembre et al., 2008a). Die Chondrozyten-Proliferationsrate ist bei *Sulf1*^{gt/gt}; *Sulf2*^{gt/gt} Doppelmutanten zum Stadium E16,5 ebenfalls unverändert (Ergebnisteil 3.3.4.). Ob es zu Veränderungen bei den postnatalen Stadien kommt, wurde jedoch nicht untersucht.

Die heterozygoten FGFR3^{ach/+} Mausmutanten zeigen des Weiteren Fusionen der Sternebrae sowie einiger Zehenglieder. Eine stärkere Aktivierung des FGFR3-Signalwegs bei homozygoten FGFR3^{ach/ach} Tieren führt zu weiteren Verwachsungen im Ellbogen-, Knie-, Hüft- und Zehen-Gelenken (Wang et al., 2001). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ein bestimmter Schwellenwert des FGF-Signals überschritten werden muss, um neben den *Synchondroses sternales* weitere Gelenke zu fusionieren. Dies könnte eine mögliche Erklärung liefern, weshalb die *Sulf1*; *Sulf2* Doppelmutanten keine Veränderungen im Extremitätenskelett zeigen.

Für die Bindung der FGF-Liganden an die FGF-Rezeptoren ist die Ausbildung eines ternären Komplexes, bestehend aus Ligand, HS und Rezeptor, notwendig. Die Überexpression von QSulf1 führt zur 6-O-HS Desulfatierung und vermindert die Bildung dieses Komplexes und somit auch die FGF-Signaltransduktion (Wang et al., 2004). Des Weiteren reagieren Zellen, welche defizient für Sulf1 und/oder Sulf2 sind hypersensitiv auf eine Stimulierung mit FGF2-Protein (Lamanna et al., 2006; Holst et

al., 2007). Eine erhöhte Sensitivität der Chondrozyten für FGF-Signale könnte daher zu den beobachteten Skelettveränderungen der *Sulf1*;*Sulf2* Doppelmutanten führen. Ein direkter Einfluss von HS auf die Regulation der endochondralen Verknöcherung wurde bereits für hypomorphe *Ext1^{gt/gt}* Mausmutanten beschrieben. Bei diesen Mutanten ist die Menge an HS auf circa 20% reduziert. Der Knochen ist bei diesen Tieren durch einen vergrößerten Bereich der proliferierenden Chondrozyten gekennzeichnet, der sich auf eine größere Reichweite des *Ihh*-Signals bei einer reduzierten HS-Menge zurückführen lässt. Umgekehrt dazu, führt die Zugabe von HS zu *ex vivo* kultivierten Gliedmaßenkulturen zur Verkürzung des *Ihh*-Signals und zu einer schmalen Zone der proliferierenden Chondrozyten (Koziel et al., 2004). Ein ähnlicher Phänotyp wurde für Mausmutanten der N-Deacetylase/N-Sulfotransferase 1 (*Ndst1^{-/-}*) beschrieben. Die HS dieser Mutanten sind weniger stark sulfatiert (Ledin et al., 2004). Außerdem ist die Zone der proliferierenden Chondrozyten bei diesen Tieren vergrößert (Hu et al., 2007). Interessanterweise überlappen die Expressionsdomäne von *Sulf1* und *Sulf2* in der Nähe der Gelenkregion mit der von PTHrP, dem von *Ihh* reguliertem, wichtigsten negativen Regulator der proliferierenden Chondrozyten.

Die Überexpression von QSulf1 im Neuralrohr führt zur vergrößerten Reichweite des Shh-Signals (Danesin et al., 2006). Beide Hedgehog-Proteine (*Ihh* und *Shh*) sind strukturell sehr nahe miteinander verwandt. Die verkürzte Zone der proliferierenden Chondrozyten in den *Sulf1*;*Sulf2* Mutanten könnte daher auf eine verkürzte Reichweite des *Ihh*-Signals, und daraus folgend einer reduzierten Expression von PTHrP und/oder anderer Zielgene zurückzuführen sein. Bei dem von *Ihh* reguliertem Zielgen *Ptch1*, konnte jedoch keine Unterschiede in der Expressionsdomäne bei E16,5 *Sulf1^{gt/gt}*;*Sulf2^{gt/gt}* Tieren festgestellt werden (Abb. 3.3.6).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass *Sulf1*;*Sulf2* Mutanten einen ähnlichen Phänotyp zu Mäusen mit aktiviertem FGF- oder reduziertem *Ihh*-Signalweg aufweisen. Dies wiederum weist auf eine Abhängigkeit dieser Wege auf eine HS-6-O-Sulfatierung hin. Jedoch könnten auch weitere Signalwege, wie beispielsweise der BMP- oder Wnt-Signalweg, durch diese Sulfatasen beeinflusst sein.

4.2.4. Einfluss von Heparansulfaten auf die skeletale Musterbildung

Zusätzlich zur gestörten endochondralen Verknöcherung könnten die beobachteten Veränderungen an den Wirbelkörpern auch durch Veränderungen, während der

embryonalen Musterbildung im Achsenskelett hervor gerufen werden. Da dieser Prozess jedoch von einer Vielzahl komplex-interagierender Signalwege reguliert wird, ist es kaum möglich die relativ mild ausgeprägten Skelettveränderungen der Sulf1;Sulf2 Mutanten auf einen bestimmten Signalweg zurückzuführen. Möglicherweise könnte die anteriore homeotische Transformation des zweiten Halswirbels (C2 → C1), die bei einem Teil der Sulf1;Sulf2 Doppelmutanten auftritt (Abschnitt 3.3.3.), auf einen reduzierten Wnt-Signalweg hindeuten. Bei Wnt3a^{-/-} Mäusen wurden ebenfalls C2 → C1 Transformation beschrieben (Ikeya & Takada, 2001). Unterstützt wird diese Hypothese durch zahlreiche Arbeiten, die eine aktivierende Wirkung durch die Überexpression von Sulf1 bzw. Sulf2 auf den Wnt-Signalweg beschreiben (Ai et al., 2003; Dhoot et al., 2001; Nawroth et al., 2007; Freeman et al., 2008).

4.2.5. Wechselwirkungen von Heparansulfat modifizierenden Enzymen

Während der HS-Biosynthese im Golgi-Apparat werden, durch verschiedene Sulfotransferasen (Ndst, Hs2st und Hs6st), Sulfatgruppen an unterschiedlichen Positionen an das Zuckergrundgerüst angefügt (Einleitung 1.4; Abb. 1.4B). Interessanterweise zeigen Mausmutanten für HS-synthetisierende und HS-modifizierende Enzyme Gemeinsamkeiten in Bezug auf den jeweiligen Skelettphänotyp. Durch die vergleichende Analyse dieser Mutanten wird es zukünftig möglich sein die Wechselwirkung einzelner Wachstumsfaktoren mit dem HS-Sulfatierungsmuster zu entschlüsseln. Beispielsweise führt ein fehlendes Shh-Allel im Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Hintergrund zur Agnathie bei einem kleinen Teil der Dreifachmutanten. Daraus kann gefolgert werden, dass HS eine Rolle für den Shh-Signalweg während des Auswachsens der Mandibel spielen. Diese Hypothese wird durch Ndst1^{-/-};Shh^{+/-} Doppelmutanten bestätigt, bei denen häufiger schwerwiegende Schädeldefektbildungen (inklusive Agnathie) als bei Ndst1^{-/-} Einzelmутanten auftreten (Grobe et al., 2005).

Die Skelettveränderungen bei Sulf1^{-/-};Sulf2^{-/-} Mutanten, wie der verkleinerte Brustkorb und das verkürzte und caudal verbreiterte Sternum, weisen Ähnlichkeiten zum Phänotyp der Hs2st^{-/-} Mutanten auf (Bullock et al., 1998). Die Analyse der stark sulfatierten S-Domäne von HS, die aus Sulf1^{-/-};Sulf2^{-/-} Zellen isoliert wurde, zeigt den erwarteten Anstieg in der 6-O-Sulfatierung und eine schwache Verringerung der 2-O-Sulfatierung (Lamanna et al., 2006). Im Gegensatz dazu wird in Hs2st^{-/-} Mutanten die

fehlende 2-O-Sulfatierung durch den Anstieg der N- und 6-O-Sulfatierung in Bezug auf die Gesamtzahl der Sulfatgruppen nahezu vollständig ausgeglichen (Merry et al., 2001). Ein ähnlicher kompensatorischer Effekt wurde ebenfalls bei Hs2st und Hs6st *Drosophila*-Mutanten nachgewiesen. So wird die fehlende HS-2-O-Sulfatierung der Hs2st-defizienten Mutante von einer stärkeren 6-O-Sulfatierung begleitet. Ebenso wie die fehlende HS-6-O-Sulfatierung der Hs6st-defizienten Mutante von einer stärkeren 2-O-Sulfatierung begleitet wird (Kamimura et al., 2006).

Die Gemeinsamkeiten der Skelettphänotypen von Hs2st^{-/-} Mutanten und Sulf1^{-/-};Sulf2^{-/-} Mutanten könnten daher auf die zusätzliche 6-O-Sulfatierung und/oder verringerte 2-O-Sulfatierung zurückzuführen sein. Eine detaillierte Analyse des Sulfatierungsmusters der HS-Ketten ist jedoch nötig, um die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den Sulfatierungsmotiven zwischen verschiedenen Mausmutanten zu identifizieren.

Zumindest im *Drosophila*-Modellsystem scheint die extrazelluläre Sulfatase Sulf1 keinen Einfluss auf das Zusammenspiel der Sulfotransferasen im Golgi-Apparat zu nehmen. So konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *Drosophila*-Sulf1 nur eine Reduktion der HS-6-O-Sulfatgruppen bewirkt, andere Sulfatgruppen aber unverändert sind (Kamimura et al., 2006).

Bei Säugetieren scheinen die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen HS-Biosynthese-Enzymen komplexer zu sein. So zeigen Untersuchungen der Disaccharid-Zusammensetzung von gereinigten HS, welche von immortalisierten Fibroblasten-Kulturen von Sulf1^{-/-}, Sulf2^{-/-} und Sulf1^{-/-};Sulf2^{-/-} Mausmutanten isoliert wurden, neben der veränderten 6-O-Sulfatierung auch Veränderungen der N- und 2-O-Sulfatgruppen. Mittels quantitativer RT-PCR wurden in diesen Zellen, veränderte Transkriptmengen für verschiedene Sulfotransferasen: *Hs2st1*, *Hs6st1*, *Hs6st2* und *Hs6st3* detektiert (Lamanna et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch bei der quantitativen RT-PCR Analyse der Sulf1^{gt/gt};Sulf2^{gt/gt} Doppelmutanten keine Veränderung der *Hs6st1*-, *Hs6st2*- und *Hs6st3*-Transkript-Mengen festgestellt werden (Abb. 3.2.5B). Möglicherweise lassen sich die Unterschiede beider Arbeiten mit dem untersuchten Gewebe (immortalisierte Fibroblasten oder E12,5 Embryonen) oder den verwendeten Sulf-Allellen (Genetrap- oder Null-Mutante) erklären.

Eine gegenseitige kompensatorische Regulation von Sulf1 und Sulf2, wie sie in einer früheren quantitativen RT-PCR Studie beschrieben wurde (Lamanna et al., 2006) konnte in der aktuellen Studie dieser Gruppe nicht bestätigt werden (Lamanna et al., 2008). Übereinstimmend dazu ist bei Sulf1^{gt};Sulf2^{gt} Doppelmutanten ebenfalls keine

kompensatorische Regulation zu beobachten. Außerdem ist bei diesen Tieren die Expression von den im Knorpel/Knochen exprimierten Sulfatasen: *ArsB*, *ArsI*, *ArsJ* und *Gns* unverändert.

4.3. Col2-Sulf1 und Col2-Sulf2 transgene Mäuse

Bei den meisten bisherigen Studien zur biologischen Relevanz von Sulf1 und Sulf2 wurden Gen-Deletions Mausmutanten verwendet (Lamanna et al., 2006; Ai et al., 2007; Holst et al., 2007; Lum et al., 2007; Ratzka et al., 2008). Eine weitere Möglichkeit die *in vivo* Funktion dieser Gene zu untersuchen, bietet die gewebespezifische Überexpression der Genprodukte. Dies wurde bisher mittels Elektroporation von Sulf1- bzw. Sulf2- Expressionsplasmiden bzw. mRNA-Transkripten bei Embryonen von Hühnern und Krallenfröschen, sowie in Myeloma-Zellen, die anschließend immundefizienten Mäusen transplantiert wurden, erfolgreich durchgeführt (Dai et al., 2005; Danesin et al., 2006; Freeman et al., 2008). Leider sind die eben genannten Methoden ungeeignet, eine Überexpression im Knorpel und Knochengewebe zu erzielen. Eine Möglichkeit um Kandidatengene im Knorpelgewebe von Hühnerembryonen zu exprimieren, bietet der RCAS-Virus, welcher beispielsweise in dieser Arbeit für *ArsI* verwendet wurde (Ergebnisteil 3.6.). Da sich die maximale Insert-Größe beim RCAS-Vektor auf circa 2,4 kb beschränkt (Logan & Tabin, 1998), konnte dieses System für Sulf1 und Sulf2, mit einem kodierenden Bereich von jeweils 2,6 kb, nicht verwendet werden. Alternativ dazu wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit gentechnisch veränderte Mäuse generiert. Bei diesen transgenen Tieren sollte die jeweilige Sulfatase durch die Verwendung des Col2a1-Promotors spezifisch in den proliferierenden Chondrozyten exprimiert werden.

Für Sulf1 konnten zwei transgene Mauslinien Col2-Sulf1^{tg199} und Col2-Sulf1^{tg208} etabliert werden. Obwohl in der genomischen DNA dieser Tiere das Col2-Sulf1-Konstrukt mittels PCR nachgewiesen werden konnte, war auf Transkriptionsebene (mittels ISH) die erwünschte Sulf1-Überexpression bei beiden Linien nicht nachzuweisen. Vergleicht man zudem den relativ geringen Anteil an transgenen Col2-Sulf1 Tieren von 7% (4/59) mit der des Col2-Sulf2-Konstruktes von 20% (3/15), so könnte man vermuten, dass einige der transgenen Col2-Sulf1 Tiere postnatal nicht lebensfähig waren. Tatsächlich war für die Stadien E16,5 und E18,5 der Anteil der transgenen Col2-Sulf1 Embryonen auf 24% (4/17) erhöht. Von diesen

transgenen Tieren war ein Embryo unterentwickelt und ein weiterer zeigte mehrere Skelettveränderungen.

Für Sulf2 konnten zwei transgene Mauslinien Col2-Sulf2^{tg78} und Col2-Sulf2^{tg80} etabliert werden. Für beide Linien konnte eine Überexpression der Sulf2-Transkripte in proliferierenden Chondrozyten nachgewiesen werden. Bei Untersuchungen der präparierten Col2-Sulf2-Skelette konnten weder bei der Linie-tg78, noch bei der Linie-tg80 Skelettveränderungen festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten die endogenen Sulf2-Transkripte liefern, welche ebenfalls in proliferierenden Chondrozyten exprimiert werden. Dadurch könnten die HS-6-O-Sulfatgruppen bereits maximal desulfatiert sein und die Steigerung der Sulf2-Enzymmenge bei den transgenen Col2-Sulf2-Tieren würde zu keiner weiteren Veränderung des HS-Sulfatierungsmusters führen.

4.3.1. Mauslinie Col2-Sulf1^{tg199} trägt eine Deletion auf Chromosom 15

Wie zuvor beschrieben, konnten bei transgenen Col2-Sulf1^{tg199} Tieren keine überexprimierten Sulf1-Transkripte festgestellt werden. Jedoch zeigten die heterozygoten Col2-Sulf1^{tg199} Tiere zwei Skelettveränderungen: (1.) verzögerte Mineralisierung der Knochen und (2.) homeotische Transformationen im Bereich der Lendenwirbelsäule. In der Literatur finden sich verschiedene Beispiele, bei denen die Lage der Integrationsstelle im Genom, als Ursache für (unerwartete) Phänotypen bei transgenen Mausmutanten identifiziert werden konnte. Als Beispiel sei die Ysb (*yellow submarine*) Mausmutante genannt, bei der das pAA2-Transgen in den Sox2-Gen Locus integrierte und dabei ein hypomorphes Sox2-Allel generierte (Kiernan et al., 2005).

In dieser Arbeit konnte die genomische Insertionsstelle des Col2-Sulf1^{tg199} Transgens mittels einer inversen PCR-Strategie ermittelt werden. Dabei wurde festgestellt, dass ein Großteil des Col2-Promotors nicht im Genom der Col2-Sulf1^{tg199} Tiere enthalten war. Die fehlende Spleiß-Donor-Sequenz und der 5'-Bereich des Col2-Promotors lieferten ebenfalls eine Erklärung für die fehlende Sulf1-Überexpression in den Col2-Sulf1^{tg199} Tieren. Des Weiteren wurden genomische DNA-Fragmente, welche die Insertionsstelle des Transgens im Col2-Sulf1^{tg199} Genom flankieren, sequenziert. Vergleiche der beiden 5'- und 3'-DNA-Sequenzen mit dem NCBI *Mus musculus* Referenzgenom zeigten Übereinstimmungen zu zwei Abschnitten auf Chromosom 15. Da diese beiden Abschnitte jedoch im Referenzgenom durch eine sehr große

Distanz (46 Mb, entspricht circa 45% der Gesamtlänge von Chromosom 15) von einander getrennt sind, ergaben sich verschiedene Szenarien für die Insertion der Col2-Sulf1^{tg199} Transgens:

- 1.) Es könnten zwei oder mehr Kopien, des Col2-Sulf1-Konstruktes in die beiden Positionen auf Chromosom 15 inseriert sein. Jedoch konnte mittels quantitativer PCR gezeigt werden, dass nur eine Kopie des Transgens im Genom integriert war (Ergebnisteil 3.5.4.).
- 2.) Durch ein kompliziertes intrachromosomales Rearrangements befinden sich beide Bereiche im Col2-Sulf1^{tg199} Genom sehr nahe beieinander.

Durch weitere Untersuchungen konnte die zweite Möglichkeit favorisiert werden. Dabei wurden bei Col2-Sulf1^{tg199} Tieren zwei Veränderungen des Chromosoms 15 festgestellt. Zum einen bei Position 41,87 - 44,25 Mb eine Deletion von 2,25 Mb und zum anderen eine Duplikation von wahrscheinlich 40 kb von Position 88,1 Mb (siehe Abb. 3.5.7). Im NCBI-Referenzgenom sind für den duplizierten Bereich keine Gene annotiert. Hingegen liegen im 2,25 Mb Deletionsbereich sechs Gene: *Angpt1*, *Eif3s6*, *Rspo2*, *Tmem74*, *Trhr* und *Ttc35*. Wahrscheinlich sind eines oder mehrere dieser Gene für die Skelettveränderungen bei Col2-Sulf1^{tg199} Tieren verantwortlich. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass diese Tiere weitere chromosomale Veränderungen, wie zum Beispiel Inversion, Rekombination oder Translokation tragen.

4.3.2. Kandidatengene für den Col2-Sulf1^{tg199} Phänotyp

Um die sechs Kandidatengene näher einzugrenzen, wurde ihre Gen-Expression zum Zeitpunkt E11,5 und E16,5 bei Wildtyp-Mäusen untersucht und die zugehörige Literatur auf mögliche Phänotypen durchsucht (Tabelle 4.3).

Für das *Ttc35* (Tetratricopeptide repeat domain 35) Protein konnte keine Expression detektiert und keine Publikationen ermittelt werden.

In der einzigen Publikation zu *Tmem74* (Transmembrane protein 74) wurde gezeigt, dass dieses Protein im Lysosom und im Autophagosom lokalisiert ist. Die Überexpression von *Tmem74* induziert in HeLa-Zellen die Autophagozytose (Yu et al., 2008). Interessanterweise konnten *Tmem74*-Transkripte bei E16,5 Embryonen in hypertrophen Chondrozyten nachgewiesen werden. Wie kürzlich gezeigt werden konnte, ist bei hypertrophen Chondrozyten die Autophagozytose ein konstitutiv aktiver Vorgang (Settembre et al., 2008b; Srinivas et al., 2008). Möglicherweise

könnte eine verringerte Menge Tmem74, die Autophagozytose und somit die terminale Differenzierung der Chondrozyten stören.

Ein weiteres Kandidatengen: Trhr (Thyreotropin-Releasing Hormon Rezeptor) wurde bereits in zahlreichen Studien untersucht. Beispielsweise vermittelt der Trhr im Hypophysenvorderlappen die Wirkung des Thyreotropin-Releasing Hormons (TRH), wodurch es zur Ausschüttung von Thyreotropin (Thyroidea-stimulierendes Hormon, TSH) kommt. *Trhr*-Transkripte werden im Hypophysenvorderlappen von adulten Ratten, sowie in verschiedenen Regionen des Gehirns, wie z.B: dem olfaktorischen System und dem Hippocampus exprimiert (Zabavnik et al., 1993). *Trhr*^{-/-} defiziente Mäuse erscheinen weitgehend normal, sind jedoch in ihrer Wachstumsrate verzögert und weisen verringerte Mengen an T3 (Trijodthyronin) und T4 (Thyroxin) im Serum auf. Es bestehen jedoch keine Unterschiede in der Wachstumsrate zwischen heterozygoten *Trhr*^{+/-} Tieren und Wildtyp-Tieren (Rabeler et al., 2004). Außerdem konnten keine *Trhr*-Transkripte im Knorpel oder Knochengewebe bei E16,5 Embryonen detektiert werden, sodass dieses Gen für den Skelettphänotyp der heterozygoten Col2-Sulf1^{tg199} Mutanten keine Rolle zu spielen scheint.

Das vierte Kandidatengen: Angpt1 (Angiopietin 1) spielt eine wichtige Rolle bei der embryonalen Blutgefäßbildung. Untersuchungen an *Angpt1*^{-/-} defizienten Mäusen zeigen, dass diese Tiere am Tag E11,5 aufgrund eines unterentwickelten Herzens und Blutgefäßsystems sterben (Suri et al., 1996). Außerdem wird Angpt1 von Osteoblasten im Knochenmark sezerniert und trägt, vermittelt über Tie2-Rezeptoren, zur Erhaltung eines undifferenzierten Phänotyps der blutzellbildenden Stammzellen bei (Arai et al., 2004). Bei menschlichen Embryonen wurde Angpt1 sowohl in Osteoblasten, als auch in Osteoklasten nachgewiesen (Horner et al., 2001). Übereinstimmend dazu konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit *Angpt1*-Transkripte im sich entwickelnden Knochen bei E16,5 Mäusen detektiert werden (Abb. 3.5.9H). Eine Osteoblasten-spezifische Überexpression von Angpt1 unter Kontrolle des Col1a1-Promotors führt nicht nur zu einer vergrößerten Anzahl an Blutgefäßen, sondern auch zu einer höheren Knochendichte (Suzuki et al., 2007). Möglicherweise könnte die verringerte Angpt1-Menge bei heterozygoten Col2-Sulf1^{tg199} Mäusen zum Phänotyp der verzögerten Verknöcherung beitragen.

Die letzten beiden Kandidatengene: Eif3s6 (Elongationsinitiationsfaktor 3 subunit 6) und Rspo2 (R-Spondin 2) wurden ursprünglich als Protoonkogene bei Milchdrüsen-Tumoren identifiziert. Bei der Analyse von zahlreichen Tumoren, die durch Infektion mit dem *Mouse Mammary Tumor Virus* (MMTV) hervorgerufen wurden, konnten

bevorzugte Insertionstellen der proviralen MMTV-DNA im Genom identifiziert werden. Zu diesen *integration sites* (Int) gehören beispielsweise Int6/Eif3s6 und Int7/Rspo2 (Callahan & Smith, 2008). Infolge der Int6 MMTV-Insertion wird ein C-terminal trunkiertes Eif3s6-Protein gebildet, welches sowohl im Zellkulturmodell, als auch bei transgenen Mausmutanten die Tumorbildung induziert (Callahan & Smith, 2008). Im Unterschied dazu trägt die Col2-Sulf1^{tg199} Mausmutante heterozygot eine Deletion des gesamten Eif3s6-Gens (sowie 5 weiterer Gene). Im Mäuse-Embryo wird *Eif3s6* im embryonalen Knochen exprimiert. Obwohl bisher noch keine Eif3s6 Deletions-Mausmutante beschrieben wurde, scheint Eif3s6, aufgrund von Untersuchungen am Zebrafisch (*Danio rerio*), eine Rolle bei der Skelettbildung zu spielen. Hinweise dazu lieferten Zebrafisch *int6*^{hi2470} Mutanten, sowie Versuche mit Morpholino-Technologie die Eif3s6/Int6 mRNA-Menge im sich entwickelnden Embryo zu reduzieren. Diese Fisch-Embryonen sind in ihrer Entwicklung gestört und besitzen verkleinerte bzw. fehlgebildete Knorpel Elemente im Kiefer. Auf molekularer Ebene wurde bei diesen Zebrafisch-Mutanten eine verringerte MEK1-Proteinmenge und ERK1/2-Phosphorylierung festgestellt (Grzmil et al., 2007).

Bei den Int7/Rspo2-Mutationen liegen die MMTV Insertionen 2 - 3 kb *upstream* vom Transkriptionsstart des Rspo2-Gens. Durch die *enhancer* Elemente der proviralen MMTV-DNA kommt es in den Tumorzellen zu einer verstärkten *Rspo2*-Transkription (Lowther et al., 2005). Die Überexpression von Rspo2 führt zu einer Verstärkung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges in Zellkultur-Versuchen und bei Krallenfrosch-Embryonen (Kazanskaya et al., 2004). Ähnlich dazu, besitzen Rspo1 überexprimierende Zellen gegenüber Wnt-Liganden eine erhöhte Sensitivität. Diese lässt sich auf eine verminderte Internalisierung der LRP6 Co-Rezeptoren zurückzuführen (Binnerts et al., 2007). Interessanterweise führt ein verminderter Wnt-Signalweg, wie er beispielsweise bei Wnt3a^{-/-} Mäusen auftritt, zur anterioren homeotischen Transformation im Bereich der Halswirbelsäule (Ikeya & Takada, 2001). Das zum Zeitpunkt E11,5 in den Somiten exprimierte Rspo2 könnte möglicherweise bei Col2-Sulf1^{tg199} Tieren, vermittelt über einen unbekannten Wnt-Faktor zur anterioren homeotischen Transformation im Bereich der Lendenwirbelsäule führen. Die kürzlich beschriebenen homozygoten Rspo2 Deletions-Mausmutanten zeigen Fehlbildungen der Hinterextremität, welche bereits während der Embryonalentwicklung durch Defekte in der Ausbildung der AER ausgelöst werden (Nam et al., 2007; Aoki et al., 2008; Bell et al. 2008). Die abgebildeten Skelettpräparationen in diesen Publikationen geben jedoch keine

Hinweise auf eine verzögerte Verknöcherung des Radius, wie sie bei Col2-Sulf1^{tg199} Tieren auftreten. Da in diesen Arbeiten das Axialskelett (Anzahl an Thorakal- und Lumbal-Wirbeln) nicht untersucht wurde, lässt sich eine Beteiligung von Rspo2 an den homeotischen Transformationen der heterozygoten Col2-Sulf1^{tg199} Mutante weder bestätigen, noch ausschließen.

Tabelle 4.3: Literatur- und Expressionsdaten für die Kandidatengene.

Gen	Literatur Phänotyp	Expression E11,5	Expression E16,5	Kandidat für Phänotyp
Angpt1	Angpt1 ^{-/-} Mäuse sind embryonal lethal (E11,5), mit unterentwickeltem Herz und Blutgefäßen (Suri et al., 1996); Col2a1-Angpt1 Überexpression in Osteoblasten führt zu erhöhter Knochenmasse (Suzuki et al., 2007)	Somiten (Abb. 3.5.9B)	Knochen (Abb. 3.5.9H)	Verzögerte Verknöcherung
Eif3s6	Zebrafisch Deletions Mutanten zeigen verkleinerte und Fehlgebildete Kieferknorpel (Grzmil et al., 2007)	Ubiquitär, Somiten (Abb. 3.5.9D)	Knochen (Abb. 3.5.9J)	Verzögerte Verknöcherung
Rspo2	Rspo2 ^{-/-} Mäuse haben fehlgebildete Hinterextremitäten (Nam et al., 2007; Aoki et al., 2008; Bell et al. 2008)	Somiten (Abb. 3.5.9C)	hypertrophe Chondrozyten (Abb. 3.5.9I)	Homeotische Transformation
Tmem74	Tmem74 Überexpression induziert in HeLa-Zellen die Autophagozytose (Yu et al., 2008)	Rückenmark (Abb. 3.5.9F)	hypertrophe Chondrozyten (Abb. 3.5.9L)	Verzögerte Verknöcherung
Trhr	Verzögerte postnatale Wachstumsrate bei Trhr ^{-/-} Mäuse, jedoch nicht bei Trhr ^{+/-} Mäusen (Rabaler et al., 2004)	Nicht detektiert (Abb. 3.5.9G)	Nicht detektiert (Abb. 3.5.9M)	---
Ttc35	Keine Information	Nicht detektiert (Abb. 3.5.9E)	Nicht detektiert (Abb. 3.5.9K)	---

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Phänotyp der Col2-Sulf1^{tg199} Mausmutante nicht einem einzelnen der sechs Gene im Deletionsbereich zugeordnet werden kann. Als wahrscheinlichste Kandidaten für den (1.) Phänotyp, der verzögerten Verknöcherung erscheinen: Angpt1, Eif3s6 und Tmem74. Die homeotische Transformation beim (2.) Phänotyp könnte von Rspo2 reguliert sein (Tabelle 4.3).

5. Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit werden die Expressionsmuster der Sulfatase-Genfamilie während der Embryonalentwicklung der Maus (*Mus musculus*) beschrieben. Mittels *in situ*-Hybridisierung wurden mRNA-Transkripte für 9 der 14 murinen Sulfatasen in den Entwicklungsstadien E12,5 – E16,5 nachgewiesen. Für mehrere Sulfatasen wurden teilweise überlappende Expressionsmuster im Knorpel/Knochen, Augenanlage und Choroidplexus identifiziert. Erstmals konnte eine spezifische Expression für *Arylsulfatase G* (*ArsG*) im Choroidplexus, für *ArsI* in hypertrophen Chondrozyten und für *ArsJ* im Gelenkspalt aufgezeigt werden. Die dynamische Expression der Heparansulfat 6-O-Endosulfatasen *Sulf1* und *Sulf2* in den verschiedenen Skelettelementen wird eingehend beschrieben.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden zwei neue *loss of function* Genetrap-Allele (*Sulf1*^{gt} und *Sulf2*^{gt}) charakterisiert. Der Skelettphänotyp dieser Tiere wurde zusammen mit *Sulf1*⁻ und *Sulf2*⁻ Deletions-Mutanten vergleichend untersucht. Bei doppelt homozygoten *Sulf1*;*Sulf2* Mausmutanten wurde ein vermindertes Körpergewicht, ein verkleinertes Skelett und verschiedene Skelettveränderungen (fusionierte Sternebrae und Schwanzwirbel, sowie Fehlbildungen: der Lendenwirbel, des 2. Halswirbels und dem Basisphenoid) festgestellt. Mit zunehmender Anzahl an mutierten Sulfatase-Allelen konnte eine höhere Penetranz und stärkere Ausprägung der Skelettfehlbildungen beobachtet werden. Am stärksten betroffen waren *Sulf1*^{-/-};*Sulf2*^{-/-} Doppelmutanten. Die Untersuchung der endochondralen Ossifikation mit molekularen Markern lässt auf eine beschleunigte Chondrozyten-Differenzierung bei den Doppelmutanten, zumindest im Sternum, schließen. Insgesamt ähnelt der Phänotyp der *Sulf1*;*Sulf2* *loss of function* Doppelmutanten dem von Mausmutanten mit einem aktiviertem FGF- oder reduziertem *Ihh*-Signalweg.

Im dritten Teil der Arbeit wurde die transgene Mausmutante *Col2-Sulf1*^{tg199} untersucht, bei der keine *Sulf1*-Überexpression vorliegt. Die Skelettveränderungen bei diesen Tieren (verzögerte Knochenentwicklung und homeotische Transformation der Lendenwirbel) werden vermutlich durch die Transgen-Insertionsstelle auf Chromosom 15 verursacht. Es wurde ein Deletionsbereich von 2,25 Mb identifiziert, welcher 6 annotierte Gene enthält. Eine eindeutige Zuordnung einzelner Gene zum Phänotyp ist jedoch nicht möglich.

6. Summary

The first part of the study, describes the expression patterns of several sulfatase gene family members in the developing mouse (*Mus musculus*) embryo. In E12.5 – E16.5 embryos transcripts, for 9 (out of 14) sulfatases could be detected by *in situ* hybridization. For several sulfatases an partial overlapping expression pattern in cartilage/bone, eye and choroid plexus was discovered. For the first time, a specific expression pattern for *Arylsulfatase G* (*ArsG*) in choroid plexus, *ArsI* in hypertrophic chondrocytes and *ArsJ* in the joints could be shown. The dynamic expression patterns of the heparan sulfate 6-O-endosulfatases *Sulf1* and *Sulf2* were carefully investigated in various skeletal elements.

The second part of the study, describes two novel loss of function gene trap alleles (*Sulf1*^{gt} and *Sulf2*^{gt}). The skeletal phenotype of the corresponding mouse mutants has been compared with *Sulf1*⁻ and *Sulf2*⁻ knock-out mutants. For both double homozygous mutants a reduced body weight, smaller skeletons and several skeletal alterations (fusions of sternbrae and tail vertebrae, malformations of lumbar vertebrae, second cervical vertebrae and basiphonoid) have been discovered. Overall penetrance and severity of the skeletal alterations is increased with increasing numbers of mutant alleles and was highest in *Sulf1*^{-/-};*Sulf2*^{-/-} mutants. Characterization of endochondral ossification at a molecular level, points towards an accelerated chondrocyte differentiation at least in the sternum. In summary *Sulf1*;*Sulf2* loss of function mutants bear similarities to mice with activated FGF or reduced *Ihh* signaling.

The third part of the study, describes a transgenic mouse mutant *Col2-Sulf1*^{tg199}, which does not overexpress *Sulf1*. The skeletal alterations in this mutant (delayed bone formation and a homeotic transformation of the lumbar vertebrae) are probably caused by the transgen insertion site on chromosom 15. A genomic deletion of 2.25 mb was identified in this mutants. This region contains 6 annotated genes in the wildtyp genome. However, it was not possible to connect the phenotype to a single candidate gene.

7. Literaturverzeichnis

A

- Abreu S, Hayden J, Berthold P, Shapiro IM, Decker S, Patterson D, Haskins M. (1995). Growth plate pathology in feline mucopolysaccharidosis VI. *Calcif. Tissue Int.* 57: 185-190.
- Ai X, Do AT, Lozynska O, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, Emerson CPJr. (2003). QSulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling. *J. Cell Biol.* 162: 341-351.
- Ai X, Do AT, Kusche-Gullberg M, Lindahl U, Lu K, Emerson CPJr. (2006). Substrate specificity and domain functions of extracellular heparan sulfate 6-O-endosulfatases, QSulf1 and QSulf2. *J. Biol. Chem.* 281: 4969-4976.
- Ai X, Kitazawa T, Do AT, Kusche-Gullberg M, Labosky PA, Emerson CPJr. (2007). SULF1 and SULF2 regulate heparan sulfate-mediated GDNF signaling for esophageal innervation. *Development* 134: 3327-3338.
- Adams SL, Cohen AJ, Lassoova L. (2007). Integration of signaling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation. *J. Cell. Physiol.* 213: 635-641.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Ambasta RK, Ai X, Emerson CPJr. (2007). Quail Sulf1 function requires asparagine-linked glycosylation. *J. Biol. Chem.* 282: 34492-34499.
- Andrade AC, Nilsson O, Barnes KM, Baron J. (2007). Wnt gene expression in the post-natal growth plate: Regulation with chondrocyte differentiation. *Bone* 40: 1361-1369.
- Aoki M, Kiyonari H, Nakamura H, Okamoto H. (2008). R-spondin2 expression in the apical ectodermal ridge is essential for outgrowth and patterning in mouse limb development. *Develop. Growth Differ.* 50: 85-95.
- Applied Biosystems. (2001). User Bulletin #2 ABI PRISM 7700 sequence detection system. http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_040980.pdf.
- Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118: 149-161.
- Arikawa-Hirasawa E, Wilcox WR, Le AH, Silverman N, Govindraj P, Hassell JR, Yamada Y. (2001). Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type, is caused by functional null mutations of the perlecan gene. *Nature Genetics* 27: 431-434.
- Ashikari-Hada S, Habuchi H, Kariya Y, Itoh N, Reddi AH, Kimata K. (2004). Characterization of growth factor-binding structures in heparin/heparan sulfate using an octasaccharide library. *J. Biol. Chem.* 279: 12346-12354.

B

- Bell AM, Schreiner CM, Wert SE, Mucenski ML, Scott WJ, Whitsett JA. (2008). R-spondin 2 is required for normal laryngeal-tracheal, lung and limb morphogenesis. *Development* 135: 1049-1058.
- Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA. (2005). Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 3324-3329.
- Binnerts ME, Kim KA, Bright JM, Patel SM, Tran K, Zhou M, Leung JM, Liu Y, Lomas WEIII, Dixon M, Hazell SA, Wagle M, Nie WS, Tomasevic N, Williams J, Zhan X, Levy MD, Funk WD, Abo A. (2007). R-spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 14700-14705.
- Bitgood MJ, McMahon AP. (1995). Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 172: 126-138.
- Brent AE, Schweitzer R, Tabin CJ. (2003). A somatic compartment of tendon progenitors. *Cell* 113: 235-248.
- Brito JM, Teillet MA, Le Douarin NM. (2006). An early role for Sonic hedgehog from foregut endoderm in jaw development: Ensuring neural crest cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 11607-11612.
- Bullock SL, Fletcher JM, Beddington RSP, Wilson VA. (1998). Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Genes Dev.* 12: 1894-1906.

C

- Callahan R, Smith GH. (2008). Common integration sites for MMTV in viral induced mouse mammary tumors. *J Mammary Gland Biol. Neoplasia* 13: 309-321.
- Chapman E, Best MD, Hanson SR, Wong CH. (2004). Sulfotransferases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43: 3526-3548.
- Chen JM. (1952). Studies on the morphogenesis of the mouse sternum. I. Normal embryonic development. *J. Anat. Lond.* 86: 373-386.
- Chen JM. (1953). Studies on the morphogenesis of the mouse sternum. III. Experiments on the closure and segmentation of the sternal bands. *J. Anat. Lond.* 87: 130-149.
- Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking sonic hedgehog gene function. *Nature* 383: 407-413.
- Colvin JS, Bohne BA, Harding GW, McEwen DG, Ornitz DM. (1996). Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nature Genet.* 12: 390-397.
- Compagnone NA, Salido E, Shapiro LJ, Mellon SH. (1997). Expression of steroid sulfatase during embryogenesis. *Endocrinology* 138: 4768-4773.
- Cosma MP, Pepe S, Annunziata I, Newbold RF, Grompe M, Parenti G, Ballabio A. (2003). The multiple sulfatase deficiency gene encodes an essential and limiting factor for the activity of sulfatases. *Cell* 113: 445-456.

D

- Dai Y, Yang Y, MacLeod V, Yue X, Rapraeger AC, Shriver Z, Venkataraman G, Sasisekharan R, Sanderson RD. (2005). HSulf-1 and HSulf-2 are potent inhibitors of myeloma tumor growth in vivo. *J. Biol. Chem.* 280: 40066-40073.
- Danesin C, Agius E, Escalas N, Ai X, Emerson C, Cochard P, Soula C. (2006). Ventral neural progenitors switch toward an oligodendroglial fate in response to increased sonic hedgehog (Shh) activity: involvement of sulfatase 1 in modulating Shh signaling in the ventral spinal cord. *J. Neurosci.* 26: 5037-5048.
- Day TF, Yang Y. (2008). Wnt and Hedgehog Signaling Pathways in Bone Development. *J. Bone Joint Surg. Am.* 90: 19-24.
- Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder, P. (1996). Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84: 911–921.
- Dhoot GK, Gustafsson MK, Ai X, Sun W, Standiford DM, Emerson CPJr. (2001). Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase. *Science* 293: 1663-1666.
- Diez-Roux G, Ballabio A. (2005) Sulfatases and human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum Genet.* 6: 355-379.
- Dierks T, Schmidt B, Borissenko LV, Peng J, Preusser A, Mariappan M, von Figura K. (2003). Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C_α-formylglycine generating enzyme. *Cell* 113: 435-444.

E

- van der Eerden BC, van de Ven J, Lowik CW, Wit JM, Karperien M. (2002). Sex steroid metabolism in the tibial growth plate of the rat. *Endocrinology* 143: 4048-4055.
- Evers M, Saftig P, Schmidt P, Hafner A, McLoughlin DB, Schmahl W, Hess B, von Figura K, Peters C. (1996). Targeted disruption of the arylsulfatase B gene results in mice resembling the phenotype of mucopolysaccharidosis VI. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8214-8219.

F

- Farach-Carson MC, Hecht JT, Carson DD. (2005). Heparan sulfate proteoglycans: key players in cartilage biology. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 15: 29-48.
- Ferrante P, Messali S, Meroni G, Ballabio A. (2002). Molecular and biochemical characterisation of a novel sulphatase gene: Arylsulfatase G (ARSG). *Eur. J. Hum. Genet.* 10: 813-818.
- Ferrante P, Messali S, Ballabio A, Meroni G. (2004). Identification and biochemical characterization of an avian sulfatase homologous to the human ARSE, the gene for X-linked chondrodysplasia punctata. *Gene* 336: 155-161.
- Freeman SD, Moore WM, Guiral EC, Holme AD, Turnbull JE, Pownall ME. (2008). Extracellular regulation of developmental cell signaling by XtSulf1. *Dev. Biol.* 320: 436-445.
- Frese MA, Schulz S, Dierks T. (2008). Arylsulfatase G, a Novel Lysosomal Sulfatase. *J. Biol. Chem.* 283: 11388-11395.

Franco B, Meroni G, Parenti G, Levilliers J, Bernard L, Gebbia M, Cox L, Maroteaux P, Sheffield L, Rappold GA, Andria G, Petit C, Ballabio A. (1995). A cluster of sulfatase genes on Xp22.3: mutations in chondrodysplasia punctata (CDPX) and implications for warfarin embryopathy. *Cell* 81: 15-25.

G

Gilbert SF. (Hrsg.) (2000). *Developmental Biology*. 6th edition. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts

Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. (2006). The control of chondrogenesis. *J. Cell. Biochem.* 97: 33-44.

Goodrich LV, Johnson RL, Milenkovic L, McMahon JA, Scott MP. (1996). Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev.* 10: 301-312.

Gorsi B, Stringer SE. (2007). Tinkering with heparan sulfate sulfation to steer development. *Trends Cell Biol.* 17: 173-177.

Göttert J. (2005). Der Einfluß von Sulfatasen auf die Bindungseigenschaften von Wachstumsfaktoren an Heparansulfate. Diplomarbeit, Humboldt Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Biologie.

Grobe K, Inatani M, Pallerla SR, Castagnola J, Yamaguchi Y, Esko JD. (2005). Cerebral hypoplasia and craniofacial defects in mice lacking heparan sulfate Ndst1 gene function. *Development* 132: 3777-3786.

Grzmil M, Whiting D, Maule J, Anastasaki C, Amatruda JF, Kelsh RN, Norbury CJ, Patton EE. (2007). The INT6 cancer gene and MEK signaling pathways converge during zebrafish development. *PLoS ONE* 2: e959.

H

Hamburger V, Hamilton HL. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88: 49-92.

Hanson SR, Best MD, Wong CH. (2004). Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 43: 5736-5763.

Hecht J, Seitz V, Urban M, Wagner F, Robinson PN, Stiege A, Dieterich C, Kornak U, Wilkening U, Brieske N, Zwingman C, Kidess A, Stricker S, Mundlos S. (2007). Detection of novel skeletogenesis target genes by comprehensive analysis of a Runx2(-/-) mouse model. *Gene Expr. Patterns* 7: 102-112.

Himly M, Foster DN, Bottoli I, Iacovoni JS, Vogt PK. (1998). The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses. *Virology* 248: 295-304.

Holst CR, Bou-Reslan H, Gore BB, Wong K, Grant D, Chalasani S, Carano RA, Frantz GD, Tessier-Lavigne M, Bolon B, French DM, Ashkenazi A. (2007). Secreted sulfatases Sulf1 and Sulf2 have overlapping yet essential roles in mouse neonatal survival. *PLoS one* 2: e575.

Horner A, Bord S, Kelsall AW, Coleman N, Compston JE. (2001). Tie2 ligands angiopoietin-1 and angiopoietin-2 are coexpressed with vascular endothelial cell growth factor in growing human bone. *Bone* 28: 65-71

Hu Z, Yu M, Hu G. (2007). NDST-1 modulates BMPR and PTHrP signaling during endochondral bone formation in a gene knockout model. *Bone* 40: 1462-1474.

I

- Ikeya M, Takada S. (2001). Wnt-3a is required for somite specification along the anteroposterior axis of the mouse embryo and for regulation of cdx-1 expression. *Mech. Dev.* 103: 27-33.
- Itoh N. (2007). The Fgf families in humans, mice, and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease. *Biol. Pharm. Bull.* 30: 1819-1825.
- Itoh N, Ornitz DM. (2008). Functional evolutionary history of the mouse Fgf gene family. *Dev. Dyn.* 237: 18-27.

J

- Jacenko O, LuValle P, Solum K, Olsen BR. (1993). A dominant negative mutation in the alpha 1 (X) collagen gene produces spondylometaphyseal defects in mice. *Prog. Clin. Biol. Res.* 383B: 427-436.

K

- Karaplis AC, Luz A, Glowacki J, Bronson RT, Tybulewicz VL, Kronenberg HM, Mulligan RC. (1994). Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene. *Genes Dev.* 8: 277-289.
- Karsenty G, Wagner EF. (2002). Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell* 2: 389-406.
- Kamimura K, Koyama T, Habuchi H, Ueda R, Masu M, Kimata K, Nakato H. (2006). Specific and flexible roles of heparan sulfate modifications in *Drosophila* FGF signaling. *J. Cell Biol.* 174: 773-778.
- Kaufmann MH. (1992). The atlas of mouse development. San Diego. Academic press.
- Kazanskaya O, Glinka A, Barrantes IB, Stannek P, Niehrs C, Wu W. (2004). R-Spondin2 is a secreted activator of wnt/ β -catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev. Cell* 7: 525-534.
- Khatri R, Schipani E. (2008). About the importance of being desulfated. *Genes Dev.* 22: 2750-2754.
- Kiernan AE, Pelling AL, Leung KK, Tang AS, Bell DM, Tease C, Lovell-Badge R, Steel KP, Cheah KS. (2005). Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature* 434: 1031-1035.
- Kohn K, Martin G R, Yamada Y. (1984). Isolation and characterization of a cDNA clone for the amino-terminal portion of the pro-alpha 1(II) chain of cartilage collagen. *J. Biol. Chem.* 259: 13668-13673.
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89: 677-680.
- Koziel L, Kunath M, Kelly OG, Vortkamp A. (2004). Ext1-dependent heparan sulfate regulates the range of Ihh signaling during endochondral ossification. *Dev. Cell* 6: 801-813.
- Kronenberg HM. (2003). Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423: 332-336.

L

- Lanske B, Karaplis AC, Lee K, Luz A, Vortkamp A, Pirro A, Karperien M, Defize LH, Ho C, Mulligan RC, Abou-Samra AB, Jüppner H, Segre GV, Kronenberg HM. (1996). PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science* 273: 663-666.
- Lamanna WC, Baldwin RJ, Padva M, Kalus I, ten Dam G, van Kuppevelt TH, Gallagher JT, von Figura K, Dierks T, Merry CLR. (2006). Heparan sulfate 6-O-endosulfatases: discrete *in vivo* activities and functional co-operativity. *Biochem. J.* 400: 63-73.
- Lamanna WC, Kalus I, Padva M, Baldwin RJ, Merry CLR, Dierks T. (2007). The heparanome - the enigma of encoding and decoding heparan sulfate sulfation. *J. Biotechnol.* 129: 290-307.
- Lamanna WC, Frese MA, Balleininger M, Dierks T. (2008). Sulf loss influences N-, 2-O-, and 6-O-sulfation of multiple heparan sulfate proteoglycans and modulates fibroblast growth factor signaling. *J Biol Chem.* 283: 27724-27735.
- Ledin J, Staatz W, Li JP, Götte M, Selleck S, Kjellén L, Spillmann D. (2004). Heparan sulfate structure in mice with genetically modified heparan sulfate production. *J. Biol. Chem.* 279: 42732-42741.
- Lefebvre V, Smits P. (2005). Transcriptional Control of Chondrocyte Fate and Differentiation. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 75: 200-212.
- Lippert H. (Hrsg.) (2003). *Lehrbuch der Anatomie*. 6. überarbeitete Auflage. Urban & Fischer Verlag, München Jena.
- Liu Z, Xu J, Colvin JS, Ornitz DM. (2002). Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. *Genes Dev.* 16: 859-869.
- Logan M, Tabin C. (1998). Targeted gene misexpression in chick limb buds using avian replication-competent retroviruses. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 14: 407-420.
- Long F, Zhang XM, Karp S, Yang Y, McMahon AP. (2001). Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development* 128: 5099-5108.
- Lowther W, Wiley K, Smith GH, Callahan R. (2005). A new common integration site, Int7, for the mouse mammary tumor virus in mouse mammary tumors identifies a gene whose product has furin-like and thrombospondin-like sequences. *J. Virol.* 79: 10093-10096.
- Lüllmann-Rauch R. (Hrsg.) (2003). *Histologie Verstehen - Lernen - Nachschlagen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Lum DH, Tan J, Rosen SD, Werb Z. (2007). Gene trap disruption of the mouse heparan sulfate 6-O-endosulfatase gene, Sulf2. *Mol. Cell. Biol.* 27: 678-688.

M

- Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. (2007). Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40: 426-62.
- Macasai CE, Foster BK, Xian CJ. (2008). Roles of Wnt signalling in bone growth, remodelling, skeletal disorders and fracture repair. *J. Cell. Physiol.* 215: 578-587.
- McLeod MJ. (1980). Differential staining of cartilage and bone in whole mouse fetuses by alcian blue and alizarin red S. *Teratology* 22: 299-301.
- Merry CLR, Bullock SL, Swan DC, Backen AC, Lyon M, Beddington RSP, Wilson VA, Gallagher JT. (2001). The molecular phenotype of heparan sulfate in the Hs2st^{-/-} mutant mouse. *J. Biol. Chem.* 276: 35429–35434.
- Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A. (2002). Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev. Cell* 3: 439-449.
- Minina E, Schneider S, Rosowski M, Lauster R, Vortkamp A. (2005). Expression of Fgf and Tgfb signaling related genes during embryonic endochondral ossification. *Gene Expr. Patterns* 6: 102-109.
- Mohammadi M, Olsen SK, Goetz R. (2005). A protein canyon in the FGF–FGF receptor dimer selects from an à la carte menu of heparan sulfate motifs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15: 506-516.
- Morimoto-Tomita M, Uchimura K, Werb Z, Hemmerich S, Rosen SD. (2002). Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in mice and humans. *J. Biol. Chem.* 277: 49175-49185.
- Mundlos S. (1999). Cleidocranial dysplasia: clinical and molecular genetics. *J. Med. Genet.* 36: 177-182.
- Mundlos S. (2000). Skeletal morphogenesis. *Methods Mol. Biol.* 136: 61-70.

N

- Nagamine S, Koike S, Keino-Masu K, Masu M. (2005). Expression of a heparan sulfate remodeling enzyme, heparan sulfate 6-O-endosulfatase sulfatase FP2, in the rat nervous system. *Dev. Brain Res.* 159: 135-143.
- Nam JS, Park E, Turcotte TJ, Palencia S, Zhan X, Lee J, Yun K, Funk WD, Yoon JK. (2007). Mouse R-spondin2 is required for apical ectodermal ridge maintenance in the hindlimb. *Dev. Biol.* 311: 124-135.
- Naski MC, Colvin JS, Coffin JD, Ornitz DM. (1998). Repression of hedgehog signaling and BMP4 expression in growth plate cartilage by fibroblast growth factor receptor 3. *Development* 125: 4977-4988.
- Nawroth R, van Zante A, Cervantes S, McManus M, Hebrok M, Rosen SD. (2007). Extracellular sulfatases, elements of the Wnt signaling pathway, positively regulate growth and tumorigenicity of human pancreatic cancer cells. *PLoS one* 2: e392.
- Noti C, de Paz JL, Polito L, Seeberger PH. (2006). Preparation and use of microarrays containing synthetic heparin oligosaccharides for the rapid analysis of heparin-protein interactions. *Chem. Eur. J.* 12: 8664-8686.

O

- Obaya AJ. (2006). Molecular cloning and initial characterization of three novel human sulfatases. *Gene* 372: 110-117.
- Ohbayashi N, Shibayama M, Kurotaki Y, Imanishi M, Fujimori T, Itoh N, Takada S. (2002). FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev.* 16: 870–879.
- Ohto T, Uchida H, Yamazaki H, Keino-Masu K, Matsui A, Masu M. (2002). Identification of a novel nonlysosomal sulphatase expressed in the floor plate, choroid plexus and cartilage. *Genes Cells* 7: 173-185.
- Ornitz DM, Marie PJ. (2002). FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev.* 16: 1446–1465.
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89: 677-680.

P

- Perrimon N, Bernfield M. (2000). Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature* 404: 725-728.

R

- Rabeler R, Mittag J, Geffers L, Rüther U, Leitges M, Parlow AF, Visser TJ, Bauer K. (2004). Generation of thyrotropin-releasing hormone receptor 1-deficient mice as an animal model of central hypothyroidism. *Mol. Endocrinol.* 18:1450-1460.
- Ratzka A, Kalus I, Moser M, Dierks T, Mundlos S, Vortkamp A. (2008). Redundant function of the heparan sulfate 6-O-endosulfatases *Sulf1* and *Sulf2* during skeletal development. *Dev. Dyn.* 237: 339-353.
- Rozen S, Skaletsky H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132: 365-386.

S

- Sambrook J, Russell DW, Sambrook JE. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sardiello M, Annunziata I, Roma G, Ballabio A. (2005). Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship. *Hum. Mol. Genet.* 14: 3203-3217.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sakai K, Hiripi L, Glumoff V, Brandau O, Eerola R, Vuorio E, Bosze Z, Fassler R, Aszodi A. (2001). Stage- and tissue-specific expression of a *Col2a1*-Cre fusion gene in transgenic mice. *Matrix Biol.* 19: 761-767.

- Schipani E, Lanske B, Hunzelman J, Luz A, Kovacs CS, Lee K, Pirro A, Kronenberg HM, Jüppner H. (1997). Targeted expression of constitutively active receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide delays endochondral bone formation and rescues mice that lack parathyroid hormone-related peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 13689-13694.
- Schwartz NB, Domowicz M. (2002). Chondrodysplasias due to proteoglycan defects. *Glycobiology* 12: 57R-68R.
- Settembre C, Annunziata I, Spampinato C, Zarcone D, Cobellis G, Nusco E, Zito E, Tacchetti C, Cosma MP, Ballabio A. (2007). Systemic inflammation and neurodegeneration in a mouse model of multiple sulfatase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 4506-4511.
- Settembre C, Arteaga-Solis E, McKee MD, de Pablo R, Al Awqati Q, Ballabio A, Karsenty G. (2008a). Proteoglycan desulfation determines the efficiency of chondrocyte autophagy and the extent of FGF signaling during endochondral ossification. *Genes Dev.* 22: 2645-2650.
- Settembre C, Fraldi A, Jahreiss L, Spampinato C, Venturi C, Medina D, de Pablo R, Tacchetti C, Rubinsztein DC, Ballabio A. (2008b). A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Hum. Mol. Genet.* 17: 119-129.
- Simonaro CM, Haskins ME, Schuchman EH. (2001). Articular Chondrocytes from Animals with a Dermatan Sulfate Storage Disease Undergo a High Rate of Apoptosis and Release Nitric Oxide and Inflammatory Cytokines: A Possible Mechanism Underlying Degenerative Joint Disease in the Mucopolysaccharidoses. *Lab. Invest.* 81: 1319-1328.
- Srinivas V, Bohensky J, Shapiro IM. (2008). Autophagy: A New Phase in the Maturation of Growth Plate Chondrocytes Is Regulated by HIF, mTOR and AMP Kinase. *Cells Tissues Organs.* (DOI: 10.1159/000151428).
- St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. (1999). Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* 13: 2072-2086.
- Storm EE, Kingsley DM. (1996). Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development* 122: 3969-3979.
- Stryke D, Kawamoto M, Huang CC, Johns SJ, Leslie A, King LA, Harper CA, Meng EC, Lee RE, Yee A, L'Italien L, Chuang PT, Young SG, Skarnes WC, Babbitt PC, Ferrin TE. (2003). BayGenomics: a resource of insertional mutations in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 31: 278-281.
- Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87: 1171-1180.
- Suzuki T, Miyamoto T, Fujita N, Ninomiya, Iwasaki R, Toyama Y, Suda T. (2007). Osteoblast-specific Angiopoietin 1 overexpression increases bone mass. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362: 1019-1025.

T

Tomatsu S, Orii KO, Vogler C, Nakayama J, Levy B, Grubb JH, Gutierrez MA, Shim S, Yamaguchi S, Nishioka T, Montano AM, Noguchi A, Orii T, Kondo N, Sly WS. (2003). Mouse model of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase deficiency (Galns^{-/-}) produced by targeted disruption of the gene defective in Morquio A disease. *Hum Mol Genet.* 12: 3349-3358.

V

Viviano BL, Paine-Saunders S, Gasiunas N, Gallagher J, Saunders S. (2004). Domain-specific modification of heparan sulfate by Qsulf1 modulates the binding of the bone morphogenetic protein antagonist noggin. *J. Biol. Chem.* 279: 5604-5611.

Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273: 613-622.

W

Wang S, Ai X, Freeman SD, Pownall ME, Lu Q, Kessler DS, Emerson CP Jr. (2004). QSulf1, a heparan sulfate 6-O-endosulfatase, inhibits fibroblast growth factor signaling in mesoderm induction and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 4833-4838.

Wang Q, Green RP, Zhao G, Ornitz DM. (2001). Differential regulation of endochondral bone growth and joint development by FGFR1 and FGFR3 tyrosine kinase domains. *Development* 128: 3867-3876.

Weir EC, Philbrick WM, Amling M, Neff LA, Baron R, Broadus AE. (1996). Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 10240-10245.

Y

Yang Y, Topol L, Lee H, Wu J. (2003). Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 130: 1003-1015.

Yoshida M, Noguchi J, Ikadai H, Takahashi M, Nagase S. (1993). Arylsulfatase B-deficient mucopolysaccharidosis in rats. *J. Clin. Invest.* 91: 1099-1104.

Yu C, Wang L, Lv B, Lu Y, Zeng L, Chen Y, Ma D, Shi T, Wang L. (2008). TMEM74, a lysosome and autophagosome protein, regulates autophagy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369: 622-629.

Z

Zabavnik J, Arbuthnott G, Eidne KA. (1993). Distribution of Thyrotrophin-releasing hormone receptor messenger RNA in rat pituitary and brain. *Neuroscience* 53: 877-887.

Zelzer E, Olsen BR. (2003). The genetic basis for skeletal diseases. *Nature* 423: 343-348.

Zhao W, Sala-Newby GB, Dhoot GK. (2006). Sulf1 expression pattern and its role in cartilage and joint development. *Dev. Dyn.* 235: 3327-3335.

8. Anhang

8.1. Proteinsequenzen des konservierten Bereichs der Sulfatasen

	1	10	20	30	40	50	60
ArsC	PNFLLIMADDL	GIGDLG	CGYGNK	TLRTPH	LDRLARE	GVKLTQ	HLAAAPLCTPSRAAFLTGR
ArsE	PNFLLIMADDL	GIGDLG	CGYGNK	TTLRTP	NIIDRLA	QDGVRL	THHLAAEAVCTPSRAAFLTGR
ArsA	PNILLIFADDL	GYGDLG	SYGHP	SSTPNLD	QLAEGGL	RFTDFY	VPVSLCTPSRAALLTGR
ArsG	PNIVIIILADD	MGWDLG	ANWAET	KDNTNLD	KMASEG	MRFVDF	HAAASTCSPSRASLLTGR
Galns	PNIVLLLMD	DMGWDL	GVNGEP	SRETPN	LDMAAEG	MLFPSF	YSANPLCSPSRRAALLTGR
ArsI	PHIIFILTDD	QGYH	DVGYH	GS.IETPT	LDRLAA	EGVKLE	NYIIQ.PICTPSRSQLLTGR
ArsJ	PHLIFILADD	QGFRD	VGYH	GS.IKTPT	LDKLA	EGVKLE	NYIVQ.PICTPSRSQFITGK
ArsB	PHVVFLVADD	LGNWDL	GFHGS	V.IRTPH	LDALA	AAGGVLD	NYIVQ.PLCTPSRSQLLTGR
Sgsh	RNVLLIVADD	GGF.ES	GVYNNT	AIATPH	LDALSR	HSILFR	NAFTSVSSCSPSRASLLTGL
Ids	LNILLIIVDD	LRP.SL	GCYGD	KLVRSP	NIIDQL	ASHSVL	FQNAFAQQAVCAPSRVSFLTGR
Sulf1	PNIIILVLT	DDQDV	.ELG...	SLQVMN	KTRKIM	EQGGAT	FTNAFVTTMCCPSRSSMLTGM
Sulf2	PNIIILVLT	DDQDV	.ELG...	SMQVMN	KTRRIM	EQGGAH	FINAFVTTMCCPSRSSILTGM
Gns	PNVLLLLLT	DDQDA	.ELG...	GMTPLK	KTALIG	EK.GMTF	SSAYVPSALCCPSRASILTGM
ArsK	PNVVLVAS	DSFDGR	LTQPGS	QVVKLP	PFINFM	RAHGTT	FLNAYTNSPICCPSRAAMWSGL
	*	**	*			*	*** **
	61	70	80	90	100	110	115 AS
ArsC	YPPRSGMAA	HGRVGV	LYLTAS	..SGGL	PPEVT	MARLLK	GRGYATALIGKWHHLGL
ArsE	YPIRTGMSS	GNHRVL	QWASG	..AGGL	PPELT	TFARVL	QGRGYVTGLVGKWHHLGL
ArsA	LPVRSGMYP	PGVLGP	SS.....	QGGL	PLEEV	TLAEVL	AARGYLTGMAGKWHHLGV
ArsG	LGLRNGVTH	NFAVTS	VGGL	PNETT	TLAEVL	RQEGYVTAMIGKWHHLGH
Galns	LPIRNGFY	TTNAH	ARNAYTP	QEI	MGGIP	NSEHLL	PELLKKAGYTNKIVGKWHHLGH
ArsI	YQIHTGLQ	HSIIRP	RQ.....	PNCL	PLDQ	VTLPQ	KLQEAGYSTHMGKWHHLGF
ArsJ	YQIHTGLQ	HSIIRP	TQ.....	PNCL	PLDN	ATLPQ	KLKEVGYSTHMGKWHHLGF
ArsB	YQIHLGLQ	HYLIM	TCQ.....	PSCV	PLDE	KLPLQ	LLKEAGYATHMGKWHHLGM
Sgsh	PQHONGM	YGLHQ	DVHH.....	FNSF	DKVQ	SLPLLL	NQAGVRTGIIGKKHVGP
Ids	RPDTTRL	YDFNS	YWRV.....	HSGN	FSTIP	QYFK	ENG YVTMSVGKVFHGP
Sulf1	YVHNHNV	Y.....	TNNENC	SSPSW	Q.AMHE	PRTFA	VYLNNTGYRTAFFGKYLNEY
Sulf2	YVHNHNT	Y.....	TNNENC	SSPSW	Q.AQHE	SRTFA	VYLNNTGYRTAFFGKYLNEY
Gns	YPHNHHV	VNN...T	LEGNC	SSKAW	QKIQ	EPYTF	PAILKSVCGYQTFFAGKYLNEY
ArsK	FTHLTES	WNNFK	G.....	LDPN	YTTW	MDIME	KHGYQTQKFGKVDYTS
						**	

Proteinsequenz-Alignment eines Teilbereichs des katalytischen Zentrums im N-Terminus von 14 *Mus musculus* Sulfatasen. Die hochkonservierte Aminosäuren (AS), d.h. mindestens bei 13 von 14 Sequenzen identisch, sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Die Sequenzbereiche wurden folgenden NCBI-GenBank Einträgen entnommen: ArsA (NP_033843), ArsB (CAI84992), ArsC (NP_033319), ArsE (CK791298), ArsG (CAI84993), Arsl (CAI84994), ArsJ (CAI84995), ArsK (CAI84997), Galns (NP_057931), Gns (NP_083640), Ids (CAI84996), Sgsh (NP_061292), Sulf1 (NP_758498), Sulf2 (BAC28804).

8.2. DNA-Sequenzen der IMAGE clone und ISH-Sonden Templates

8.2.1. Arsl cDNA-Sequenz (IC 2802810)

GCCCAGCCCGTGTCTCCCTCCCCTTCCCCCTGTGGGGTCTGCCCCACCTCCCAGCCTGGAGCACTGCTTTGCGGG
 GATACCGGGCGGGGTCAGAAGCTCAGCTAGGGGAATTGGGGGTGCGGGGAGGGAGGAGAAATGGAAAGCAGAAGC
 GAGAGAAATTAAGAGGCGGGAGGGATCGGGGTAAAAGGGAAGCGGAGAGTCCGGGGATGGTGGAGAGCACTTTTG
 GGAAGCCTCCACTCCACGACTCAGGCTGGCCCGTCAGAGCTGGGGGAGAGGGCTGCGGGAGGAGGCTCGGGCGGA
 GCCTGACCTTCCGGGAGCGCCCTGCTGCCTGTCCGAGGGTCTGGACCAGAGCCCCGAGGGCTCTGACTGCATCC
 AGGCGGGCGGGAGAGCAGGCGTTGCGCCCCCTAGCGCGGCAGGCTCTGAGGTCTTGGGAACCCGCTCGCCCAGAC
 CGGCGTCGCA**ATG**CATGCTCTCTCAGGATTCTCCCTGGTCAGCCTACTCAGCTTGGGCTACCTGTCTGGGATTG
 GGCTAAGCCCCGGCCTTGTGGCTGATGGGCTGCCGAGGCTGGCGATCAGCCTTCGGTGGCTCCACCGCAGCCTCC
 ACACATTATCTTCATCCTCACCAGACGACCAAGGGTACCACGACGTGGGATACCATGGCTCGGATATCGAGACCCC
 AACGCTGGACCGGCTAGCAGCTGAGGGCGTCAAACCTGGAGAATTATTACATCCAGCCCCATGTACACCTTCGAG
 GAGTCAACTCCTCACCAGGAGGTACCAGATCCATACAGGATTGCAGCACTCCATTATCCGCCCCAGCGCAGCCCAA
 CTGTCTGCCCCCTGGACCAGGTGACGCTGCCCCAGAAGCTACAGGAGGCAGGCTACTCCACCCACATGGTGGGCAA
 GTGGCATCTGGGCTTCTACCGGAAGGAGTGCTTGCTACCCGCCGGGGCTTCGACACCTTCTGGGTTCCTTCAC
 AGGCAATGTGGATTACTACACCTACGACAACCTGTGATGGCCAGGGGTTTGTGGGTTTGACCTGCACGAGGGTGA
 GAGCGTGGCCTGGGGGCTCAGCGGCCAGTACTCCACTATGCTCTACGCTCAGCGTGCAAGCCACATCCTGGCCAG
 CCACAATCCCCAGAATCCCCCTCTTTCTCTATGTGGCCTTCCAGGCAGTACACACGCCCTACAGTCACCTCGAGA
 ATACCTATACCGCTACCGCACGATGGGCAACGTAGCACGGCGCAAGTACGCAGCCATGGTGACCTGCATGGACGA
 GGCTGTGCGTAACATCACCTGGGCCCTCAAGCGCTATGGTTTCTATAACAACAGTGTCAATTAT**CTTCTCCAGTGA**
CAATGGTGGCCAGACCTTCTCAGGGGGTAGCAACTGGCCCCCTTCGAGGACGCAAGGGTACTTACTGGGAAGGTGG
TGTGAGGGGCTGGGTTTTGTCCACAGCCCACTGCTCAAGAAAAAGAGACGGACCACTCGGGCCCTGGTCCATAT
CACAGACTGGTACCCAACACTGGTGGGTCTGGCAGGCGGTACTACATCAGCAGCTGATGGGCTGGATGGCTATGA
TGTATGGCCAGCCATTAGTGAGGGCCGGGCTCACACGCACAGAGATCTACACAACATCGACCCCCCTCTACAA
CCATGCCCGGCATGGATCCTTGGAGGGTGGCTTTGGGATCTGGAATACAGCAGTGCAGGCTGCTATCCGAGTTGG
GGAGTGAAGCTGCTCACTGGAGACCCAGGCTATGGTGACTGGATTCCACCTCAGACACTGGCCCTCCTTCCCTGG
CAGCTGGTGAACCTGGAGCGGATGGCCAGCATCCGCCAGGCTGTGTGGCTCTTTAACATCAGTGTGACCCCTTA
CGAACGAGAGGACCTGGCTGGCCAGCGACCCGATGTAGTCCGCACCCTTCTGGCTCGCCTGGCTGATTATAACCG
TACTGCCATCCCCGTGCGTTACCCAGCTGCGAACCCTCGGGCCCATCTGACTTTAATGGGGGTGCTTGGGGGCC
CTGGGCCAGTGAGGAGGAGGAAGAGGAGGAGGAAGAGGAGGAAGGCAGAGCTAGAAGTTTCTCCCGGGGTCCG
CCGCAAGAAGAAATGCAAGATTTGCAAGCTTCGATCTTTTTTCCGTAAACTCAATACCAGGCTGATGTCCACCG
GATCTGATGGCTTAGGGTGGCAGGGAATCTCAGTTCCCTCAGACACTCTCCCTTTGCTGGTTCTCAGGGAGGAG
 GCAAGGTCAAGTCTTCATCTGTAGGCACGTGGAGGGAGGGCACAGAAGCCCTCAGCTGAATAGGGTGGGACTTGG
 AGAAGGGCAGCAACCAGGCTGGGTTGCCTGGGTACAAATCCTGCCTCTTTCTGATGAGTTTCTTTTTGCCCTC
 AGGTTACCTATAGCAGCATTCTGCCTCAATCTCACCCCTAAGATGAGCTCTGGTGACTTTAGGACTCCAGTGATAC
 ACATGTGTCTGGGGCCATGGCAGGGTTTCTTGCTGACCTTGTACCTTCCAGACAACCTTGAGTCCATGACCCCTCT
 TTCCAGCTCTCTGTGGTGTCTCTGGATATCAGCTGGAGTATGGCCAGCTGGCTGCTGCTCTGTTGAACAACCTCAA
 TGAGAGAACCGGACAGGGTAGGCTCTGAGAAATCTTTACGTTTCTGGAGCCTCATGACTTGGGAGCCTAGTGGAAT
 TCTTCTCTTTTGGTCCCAACATCTGGGGGAGGGGAACTGGCTGAGCCTGAGCCATGTATAGTGAGGGTGGG
 GGAAGCAGCTGTGAAGGAGCCTTTGATTTGGTCTTGAACACAGTTCTTCCCCACAGGGCCTTGATTTCCCTACT
 TGCAAAGGAGTAGGGAAATATGAGCCTTGGCTCTGCCTACCTCACGTTGCTGGTGTGTAGAAAACCTGGCCAGGC
 TGATGGTTGTGGAGGAGCCTGTGAACCTTGATTAAGTGCCATTATCCAGAAAAAATAAacctcgtgccgaatt
 cttggcctcgagggccaaattccctatagtgagtcgtattaaattcgtaaatcatggtcatagctgttccctgtgt
 gaaattgttatccgct

Die im Plasmid (IC 2802810) enthaltene *Mus musculus* Arsl (Arylsulfatase I) cDNA Sequenz (2986 bp) ist in Großbuchstaben und Teile der pT7T3D-PacI Vektor Sequenz sind in Kleinbuchstaben dargestellt. Das Start- (ATG) und Stopcodon (TGA) ist dick gedruckt.

Arsl ISH-Sonde #47 (885 bp, 3'UTR): Ein PCR-Produkt vom Plasmid (IC 2802810, siehe oben) mit Primer Arsl-F und M13-rev (unterstrichen) diene als DNA-Template. Die T7-Polymerase Bindungsstelle ist grau unterlegt.

Arsl-intern ISH-Sonde #84 (850 bp, CDS): Ein PCR-Produkt vom Plasmid (Arsl-CDS-stop clone C) mit Primer Arsl-879-F und M13-21-fwd diene als DNA-Template. Der entsprechende Arsl Teilabschnitt (Arsl-879-F bis Stopcodon) ist bei Plasmid (IC 2802810) kursiv und dick gedruckt dargestellt. Die anschließende pCR4-TOPO Vektorsequenz des Plasmid (Arsl-CDS-stop clone C) ist nicht eingezeichnet.

8.2.2. Sulf1 cDNA-Sequenz (IC 4500954)

CAGTTTTATCTGCAAGTTGGAAATCCGAGGCCAGAGGCCAGGAGAGAGGGCGGCTGGGATCAGAGGCCAAGCCT
 CCCTCCCTGGCTCCTGGAGCCCCGAGAGGTCAGGGCGATAAGGAACAATGACTCTCCCATTCAGGAGGAGGAAG
 GAAGTCCCTGCTGCCACCTAATCTCTGCTCCTCTGCTTCTCCCTGCTCCCGAGCCTTTTCTCTAGAGAAGACTT
 TCAAGGCGACTTTTGTGCTGAGGGCCAGCCGCCATCAGCTTGAGAAGGTGAATTTGGCAAATGACATGAAGATTC
 TTCAAGGCAGAATCCTTGCAGGGAAGCTTCAAAGGACTCCATCTGCAGATGTTCTGAAAACCTCTGAGTCTAGAA
 ATTGATTATTACCCAGGATACCTAATTCAAGCTCCAGAACTCAGCCGACCAAGGAGCTTGGAAAGACTTTGCAA
 CTTTGGACCAAGCACAA**ATGA**AGTATTCCCTCTGGGCTCTGCTGCTTGCCGTGCTGGGCACACAGCTGCTGGGAAG
 CCTGTGTTCCACCGTTCCGGTCCAGAGGTTCCGAGGAAGGATACAGCAGGAACGAAAAACATCAGACCCAATAT
 TATCCTTGTGCTCACTGACGACCAGGATGTGGAGCTGGGTTCCCTGCAAGTCATGAACAAGACGAGAAAAGATCAT
 GGAACAGGGTGGGGCCACCTTACCAATGCCTTTGTGACCACGCCCATGTGCTGTCCATCACGCTCATCCATGCT
 CACTGGGAAGTACGTGCATAACCACAATGTCTACACCAACAATGAGAACTGCTCGTCTCCCTCGTGGCAGGCAAT
 GCACGAGCCTCGGACCTTTGCTGTGTATCTCAACAACACCGGCTACAGAACAGCCTTTTGGAAAAATACCTCAA
 TGAATACAATGGCAGCTACATCCCTCCTGGATGGCGAGAATGGCTCGGATTAATCAAGAATTCTCGTTTCTATAA
 TTACTGTGTTGTCGCAACGGCATCAAGGAGAAGCATGGATTTGATTATGCAAAGGATTACTTCACAGACTTAAT
 CACTAACGAGAGCATTAACTTCTCAAATGTCTAAGAGAATGTATCCCATAGGCCCATATGATGGTGATCAG
 CCATGCAGCACCACATGGCCCTGAAGACTCCGCCCCACAGTTTCAAACCTGTACCCCAATGCCTCCCAACACAT
 AACACCCAGCTATAACTATGCACCGAACATGGACAAACACTGGATCATGCAGTACACAGGGGCCCATGTTGCCTAT
 CCACATGGAGTTACCAACAGTCCCTCCAGCGCAACGACTGCAGACTCTGATGTGAGTTGACGACTCTGTCGAGAG
 GTTGTACAACATGCTTGTGGAGAGCGGGGAGCTGGACAACACTTACATCATCTACACTGCGGACCACGGCTACCA
 CATTGGACAGTTTGGGCTGGTCAAGGGGAAATCCATGCCCTACGACTTTGACATCCGTGTGCCTTTCTTCATTCTG
 TGGTCCAAGCATAGAACCAGGGTCGATAGTCCACAGATTGTTCTGAACATCGACCTAGCTCCTACCATTTCTGGA
 TATTGCTGGTCTTGACTCTCCTTCTGATGTGGATGGTAAATCTGTCTCAAACCTTCTAGACCTGGAAAAGCCGGG
 TAACAGGTTTCGGACAAACAAGAAGGCCAAAATCTGGCGTGATACATTCTAGTGGAAGAGGGGAAATTTTACG
 GAAGAAGGAGGAATCCGGCAAGAATATCCAACAGTCAAACCACTTGCCCAATATGAGAGGGTCAAGGAACCTGTG
 CCAGCAAGCCAGATACCAGACAGCCTGTGAGCAGCCTGGGCAGAACTGGCAGTGCATCGAGGACACATCCGGCAA
 GCTCCGAATCCACAAGTGTAAAGGGACCCAGCGACCTGCTCACG**GTCCGTCAGAATGCACGCAACCTCTACTCTCG**
CGGATTGCATGACAAAGACAAAGAGTGCCATTGTAGGGACTCTGGCTATCGCTCGAGCAGAAGCCAGAGAAAGAA
TCAAAGGCAGTTCTGAGGAACAAGGGAAACACCAAGTATAAGCCCAGATTTGTGCACACCCGGCAGACTCGGTC
CCTGTCTGTTGAATTCGAAGGTGAAATATATGACATCAACCTGGAAGAAGAAGAACTGCAAGTGTTACCACCAAG
GAGCATTGCCAAGCGCCCATGATGAGGGTCACCAGGGCTTCATTGGCCACCAGGCTGCTGCTGGTGACATCAGGAA
 TGAGATGTTGGCAGACAGCAACAATGCTGTGGGGTTACCCGCCACTGTCCGGGTGACACACAAGTGCTTTATTCT
 TCCAAACGACACAATCCACTGTGAGAGGGAGCTTACCGTACGCCAGAGCGTGGAAGGACCATAAGGCCCTACAT
 TGATAAAGAGATTGAAGTTCTACAAGATAAAATTAAGAATTTAAGGGAAGTGAGGGGACACCTAAAGAAAAAGGAA
 ACCTGAGGAGTGTGGCTGTGGTGACAGAGCTATTACAACAAAGAGAAAGGTGTCAAACGACAGGAGAAGCTAAA
 GAGTCACCTTCACCCCTTCAAGGAGGCTGCTGCCAGGAGGTGGATAGCAAACCTTCAGCTCTTCAAGGAGCATCG
 GAGGAGGAAGAAGGAGAGGAAGGAGAAGAAACGGCAGAGGAAGGGAGAGGAGTGTAGCCTGCCTGGCCTTACCTG
 CTTACCCATGACAACAACCACTGGCAGACTGCCCATTTCTGGAACCTTGGGATCTTTCTGTGCCTGCACAAGTTC
 TAACAACAATACCTACTGTGTTTTCGTACAGTCAACGAGACGCACAATTTCTGTGTTTGTGAGTTTGCTACTGG
 CTTTCTGGAATATTTTCGACATGAATACGGATCCTTATCAGCTCACAAATACAGTACACACAGTAGAACGGAGCAT
 CTTAAATCAGCTACACATACAGCTGATGGAGCTCCGAAGCTGCCAAGGGTATAAACAGTGCAACCCAAGACCCAA
 GAGCCTGGACATTGGAGCTAAAGAAGGAGGAACTATGACCCGCACAGAGGACAGTTATGGGATGGATGGGAAGG
TTAGTCAGTCCAATATTACTTCAGACACCAGCTGGCAAGGCCTGGAGGAGTTATCCGGTGCAAGCAACATCGATG
 AGTACAGGTCTAACCCCTAGACTAAGTCTGGAGGACTGGACTAACTACCTGAGGGCTGTCTACAGAGCCTTTGCAC
 TGCTGAACAGTACCCCTGATCCAACAAGCAATGGGACTCCAACACACAAGGTGGTGACTTCTTGCTACCT
 CTGCTGAGCGCTTGGTGCCAGCAGAGATGGCTTCTGCAGAATCAGGTGAAGACCCAAGTCACTGTGGTTGGGGAAA
 CACCTCCTTTGACCTTGCCAGTCAACCTCCAAACCTGCATCTGAACAGACCAACGTTAAGTCCAGAGAGAAAAAC
 TTGAATGGGATAATGACATTCCAGAAGTGAATCATTTGAATTTCTGAACACTGGAGAAAACTGAGAAGCAGATAG
 GATGGGAGGAGCTGCATCATCTGAAGGTGACGTCGTGAGTGGCAATGGTATGACAGAGCTGCTGCCCCAGTCTC
 ATCTTGGGCATCAGCTCACCAGTCAGCACCAACAAAAATGTTCCAGGATGTGGAGACAGAGAAGGATGCTTTTG
 AAGATCAATTGCGTCTCTTGTCCACTCTGACAGAACTCCGGTTCATCGGGTGTTCGATGTGTCCGCTGTGGAGC
 AGCCTCTTCACTGCTCCTTCCAGACACAGGAGAGATGTTGGCCAAGATGGGGCAGAGTGATACAAGGAGTGCTGACAA
 ATCTCGAAGGCAGTGCCTCCGCTCCAGTCATCTCTGCTTAGATTAGATGTTGCCTAACATAATATTTCTTTCCAT
 GTTTTGGATTAGTAACTAGTGGTGGCAATCATGACTGCCAACATTCTGAGCCCCACCTCCACCCCCCTCCCTGG
 GCACACTCATGTGCACAGCAGACACTCATGTGCACGTGTGTGGGCAATGCTCACACAGACTCATTGTAACCTTGCT
 ATTCTACCAAGAAGGGAGAGGTGGGGGCACATTTTCTGTTTGTATGCTTTGTTTTTGGTACTAAAACAGTATTAT
 CTTTTGAATATAGTAGGGACATGAGTATATAAAATCTATCCAGTCAAAATGGCTAGAATTGTGCCTTTGTAAAGTT
 TAAAAGTTTGTATGCCCCCTGGTGAGTCTGTCAACATATCTTCTGCTGCCTGCATAGTGAAGTTGAATTTGTTTCT
 AACCATTGGAATTTTTTCAACATCATCTTTGTTGGTCAATGATTTTGCACCTTTGAGTTTGAATTTGCTGTCTGC
 TTGGTTGGTAGTGTTATTATTTTTCTTTTAAACAGGCTTATCAGAGTCACACACTTTGTCTAGGAAGGACAAAAG
 GAATAGACCCCCGGCAAGGACACACAGTATGGATCACATATTGTTTAGCGTACGCTTTTCCCAGGAACCATTGCA
 TGTATTTTACCTCGACGTGCTAAACTTGATTAGCAGAAAGGCATGGCTCACAATGTTGGTGGTAAGAAATAAATC
 CTGCGGGAATAAGCAATAAATAAAGCAAGAATGAAAAAAGggggcgccgctctagagtatccctcga
 ggggccaagcttacgcgtaccagctttctgtacaaagtgg**tcctatagtgagtcgtatta**

Die im Plasmid (IC 4500954) enthaltene *Mus musculus* Sulf1 (Sulfatase 1) cDNA Sequenz (4623 bp) ist in Großbuchstaben und Teile der pCMV-SPORT6 Vektor

Sequenz sind in Kleinbuchstaben dargestellt. Das Start- (ATG) und Stopcodon (TAG) ist dick gedruckt.

Sulf1 ISH-Sonde #14 (1553 bp, 3'UTR): Ein PCR-Produkt vom Plasmid (IC 4500954) mit Sulf1-F und T7-Primer (unterstrichen) dient als DNA-Template. Die T7-Polymerase Bindungsstelle ist grau unterlegt.

Sulf1-intern ISH-Sonde #45 (273 bp, CDS): Ein PCR-Produkt vom Plasmid (Sulf1-intern clone 2) mit Primer Sulf1-1453-F und M13-rev diente als DNA-Template. Der entsprechende Sulf1 Teilabschnitt (Sulf1-1453-F bis Sulf1-1725-R) ist bei Plasmid (IC 4500954) kursiv und dick gedruckt dargestellt. Die anschließende pCR4-TOPO Vektorsequenz des Plasmid (Sulf1-intern clone 2) ist nicht eingezeichnet.

8.2.3. Sulf2 cDNA-Sequenz (IC 3155559)

ATCCTGAGGGAAGAGGGGAAGGAATCCCATCCTCACGACACCACCTCGGCCTCTGCATCCAGGAAGAAGCAAAGG
 ACCAGCAAGCCACGCCA**ATGG**CACCCCTGGCCTGCCACTATGGCTGCTGTCCACCGCTCTCCTCTCCCTGCTGG
 CTGGCAGCTCGGCCTTCTCTCCCATCCCCGCCTGAAGGGACGCTTCCAGAGGGACCGCAGGAACATCCGGCCCCA
 ACATCATCTTGGTGCTTACGGATGACCAGGATGTGGAGCTGGGCTCCATGCAAGTGATGAACAAGACAAGGCGTA
 TCTATGGAGCAGGGCGGGGCGCACTTCATCAATGCCTTCGTGACTACACCAATGTGCTGTCCGCTCGCTCTCCCA
 TTCTCACCGGCAAGTACGTCCACAACCACAACCTACCAACCAATGAGAATTGTTCCCTCGCCCTCCTGGCAGG
 CCCAGCACGAGAGCCGCACCTTCGCCGTGTATCTCAACAGCACAGGCTACCGGACAGCTTTCTTCGGAAAAATACC
 TCAATGAGTACAACGGCTCATACGTGCCGCCCGGCTGGAAGGAGTGGGTGGCCTACTTAAGAACTCCCGCTTTT
 ATAATACTACACTCTGCCGAATGGGGTGAAGGAGAAACATGGCTCGGACTACTCCACGGATTACCTCACGGATC
 TCATCACCAATGACAGTGTGAGCTTCTTCCGAACATCCAAGAAGATGTACCCACACAGGCCCCGTGCTCATGGTCA
 TCAGCCACGCGGCTCCCCATGGCCCCGAGGACTCAGCACCCACAGTACTCACGGCTCTTCCCCAATGCGTCCCAGC
 ACATCACACCGAGTTACAACATATGCACCCAACCCAGACAAGCATTGGATCATGCGCTACACGGGACCCATGAAGC
 CCATTACATGGAATTCACCAACATGCTACAACGAAAACGCCCTACAGACCCCTCATGTCTGTGGATGACTCCATGG
 AGACGATCTATGACATGCTGGTGGAGACGGGGAGCTGGACAACACGTACATCCTGTACACCGCCGACCACGGCT
 ACCACATTGGCCAGTTTGGGCTGGTGAAGGGCAAGTCTATGCCGTATGAATTCGACATCAGAGTCCCGTTCTACG
 TGAGGGGCCCCAACGTGGAAGCTGGCTCTCTGAACCCCCACATTGTCTCAACATTGACCTGGCCCCCACCATAC
 TGGATATCGCTGGACTGGACATCCCTGCAGACATGGACGGGAAGTCTATTCTCAAACACTACTGGACTCAGAGCGGC
 CAGTGAACCGGTTCCACTTGAAAAAGAAGCTGAGGGTCTGGCGAGACTCCTTCTGGTGGAGAGAGGGCAAACCTGC
 TCCACAAGAGGGGAGGTGACAAAGTGAATGCCAGGAGGAGAACTTCTTGCCCAAGTACCAGCGCTGAAGGACC
 TGTGTACGCGAGCTGAGTACCAGACAGCATGCGAACAGCTGGGGCAGAAGTGGCAGTGTGTGGAGGACGCTTCTG
 GGACGCTGAAGCTGCACAAATGTAAAGGCCCATGCGGTTTGGTGGCGGCGGTGGCAGCAGAGCCCTCTCCAACC
 TGGTGCC**CAAGTATGACGGCCAGAGCAGCGAGGCCTGCAGCTGTGACAGTGGCGGTGGAGGGGACTACAACTGG**
GCCTGGCTGGACGCCGTAAGCTCTTTAAGAAAAAGTATAAGACCAGCTATGCCCCGAACCGCTCCATCCGTTCCG
TGGCCATCGAGGTGGACGGTGAATATACCACGTAGGCTTGGATACTGTACCTCAGCCCCGCAACCTTAGCAAGC
CGCATGGCCAGGGGCCCCGTAAGACCAAGATGACAAGGATGGTGGCAGTTTCAGTGGTACTGGTGGCCTTCCAG
 ATTATTCTGCCCCCAATCCCATCAAAGTGACCCATCGGTGCTACATCCTTGAGAATGACACAGTCCAGTGCGACT
 TGGACCTGTACAAGTCCCTGCAGGCTTGGAAGACCACAAGCTGCACATCGACCATGAGATCGAAAACCTGCAGA
 ACAAATTAAGAACCTTCGAGAAGTCAGGGGTACCTGAAGAAGAAGCAGCCGGAAGAATGTGACTGCCATAAAA
 TCAGTTACCACAGCCAACACAAAGGCCGTCTCAAGCACAAAGGCTCCAGCCTGCACCCTTTCAGGAAGGGTCTGC
 AGGAGAAGGACAAGGTGTGGCTGCTGCGGGAGCAGAAACGCAAGAAGAACTGCGCAAGCTGCTCAAAACGGCTGC
 AGAACACGATACGTGACGATGCCCCGGCCTCACGTGCTTTACCCACGACAACCACCTGGCAGACGGCGCCAC
 TCTGGACGCTGGGGCCGTTCTGCGCCTGCACGAGGCTCAACACACACGTAAGTGGTGTGAGGACCATAAATG
 AGACCCACAACCTTCTCTCTGCGAATTTGCAACCGGCTTCATAGAATACTTTGACCTCAGTACAGACCCCTACC
 AGCTGATGAACGCGGTGAACACACTGGACAGGGACGTCCTTAACCAACTGCACGTGCAGCTCATGGAGCTAAGGA
 GCTGTAAAGGCTACAAGCAGTGCAACCCCCGACCCGCAACATGGACCTGGGGCTTAGAGACGGAGGAAGCTATG
 AACAATACAGGCAGTTTCAGCGTCGAAAATGGCCAGAAATGAAGAGACCTTCTTCCAAATCACTGGGACAGCTAT
 GGGAAAGGTTGGGAAGGC**TAA**GCGGCCATAGAGAGAGGAACCTCCAAAACAGGGGCTCGTGTGGCTGCCAGGC
 CATGCAAAAAACACCCGATTCCAGAAAGTGAATGTTGGAAGTGGGAGACCTGACAGAAGGCAGGGCCTGCTCTT
 GGGACAGGAAATCTGGAGGACAGCGCCTGGAGCTTCCGATGCTCAGTCTTCTTTGCCCTGCTTTGCTCTGGATCA
 AACCTCACTGGCTGCTCTGGGATGCGTGCTCACACCTGGAGTCTCTGCTCACCCCTTTCAGAGGCTCACAAAGACA
 AAGGAATAATTTCCATGGACACTTCTCCAGAGATGGAATTTGCTGGGATTCGCCCACTCTCTCCCTGCACCCC
 TCCCCCAGTCATCTAGGGAAGCAAGCTTGTTTTAACCTTCTTACTCTTTGGAGAAAGCACGGACATCCAGGTGC
 TGTCAACCTCACAGTCTTGACAAAGTCTATAGCACAAAACAGTACCATTACACAGGCTGGTTGACCTGGCTGGCT
 CAGAAGCTGCCTTACCACATACATGACCGCTCACACGTAACCAACACAGGGAATTGTAGGGGAATCTCACTAAT
 ATGAAATCCCGCTTTTCAAGAGTCGCGGTGCTCAATAAACGCTGTGGCTAGGATCAAGGATAATCCCTTGAGCTTT
 CAGACATTTATCTCTGCCCGGATTGCTTCTTTGTTATCCATCCAGAACTGATGTTTTTCTAAGGTACCGAAA
 CCCCCAAGTTGATGTGTGCTCTGTGTTTTAATGACATTGTATTTGTAAAGTTTTGTAGTATAAGTACCATCTTACA
 GTGTTCTCTGCCCCAGCCAATGTCTAGCTATTGGTATGAAAAAAAATCTTTGAATTTTTGTAAAAAAA
 AAAGcgagcgcgtgggtcgacgatatcccggaattccggaccggtaccagcctgcttttttgtacaaacttggtt
 ctatagtgtcacctaataatg

Die im Plasmid (IC 3155559) enthaltene *Mus musculus* Sulf2 (Sulfatase 2) cDNA Sequenz (3603 bp) ist in Großbuchstaben und Teile des pCMV-SPORT6 Vektor Sequenz sind in Kleinbuchstaben dargestellt. Das Start- (ATG) und Stopcodon (TAA) ist dick gedruckt.

Sulf2 ISH-Sonde #15 (946 bp, 3'UTR): Ein PCR-Produkt von diesem Plasmid mit Sulf2-F und Sp6-Primer (unterstrichen) dient als DNA-Template. Die Sp6-Polymerase Bindungsstelle ist grau unterlegt.

Sulf2-intern ISH-Sonde #46 (285 bp, CDS): Ein PCR-Produkt vom Plasmid (Sulf2-intern clone 2) mit Primer Sulf2-1491-F und M13-21-fwd diente als DNA-Template. Der entsprechende Sulf2 Teilabschnitt (Sulf2-1491-F bis Sulf2-1775-R) ist bei Plasmid (IC 3155559) kursiv und dick gedruckt dargestellt. Die anschließende pCR4-TOPO Vektorsequenz des Plasmid (Sulf2-intern clone 2) ist nicht eingezeichnet.

8.2.4. Template DNA-Sequenz der ArsA ISH-Sonde #11

CTACAGATCTGCTGTCAGCCGAGCTGCACTCCCCACCCTGTCTGCTGCCACTGCCAGGCTCCCAGTCC**TGA**GGG
 GACTGGAGAAATCACGGGGGTCTTCAAGGGTAGCCAGGACCCCTAGCCCTGTCTGAGTGTGTGATGGTTCAC
 CAGAGGGACAGGGACAAGTGTGTAGTTTGTATCTGGTAATGTAATAACACCAGCTGAGACTTGAGACGTGCTAAT
 TCATCTAGTCCTTGTGGTAACTCTGAGGTCAGTACTATTCTGCTGTGCTACAAGACAAGGACATTGACGCATAGG
 GAATCTCGTGACCTTTCCAAGTCCGATGCCACCTTACCAGAAAGAGCTTGAGCTAGGATTTGAACCCAGGCACC
 CTGGGTTTTAAATTTGTCCCACCCTGGTGATCTGCGTGTGTCCATGGACACACCGCTGAAGCGAAGACATGTCCC
 TTCACAGAAACCGTAATGAGTTCAAGTGCCAGGAAGTGGGGGTGGGGGAGTGGTGAGGGCAGAGGAACCTTAA
 AGATGCAAAGCACCTGGAAGACAGGCTTTCTCAAGAAGCAATGCCAGAGGCCCTGGAAGTGGTCAGCTTGGTTC
 TTTAAAGAAATCAGCTGTCTGGAGTTAGGTGATAAAGTATCATTCCGGGTAGAGTTAAAGGACCTGGGGACCCT
 GCTAGATCCCAGGAAGGACCATCAGCAGCTTCTGAGACTGCCTCATGGGGCTCACTTGTCTCTCAAGCTCTGAAT
 TTCTCCTTTGTGCATACTTCAAGTAATTTTCTACAAAAAAGggcgccgctctagagtatccctcga
 ggggcccaagcttacgcgtaccagcttcttgtacaaagtggg**ccctatagtgagtcgtatta**

ArsA ISH-Sonde #11: PCR-Produkt mit ArsA-F und T7-Primer (unterstrichen) vom Plasmid (IC 3669438). Die *Mus musculus* ArsA (Arylsulfatase A) DNA-Sequenz (799 bp) ist in Großbuchstaben, die pCMV-SPORT6 Vektor Sequenz in kleinen Buchstaben, das Stopcodon dick gedruckt, die T7-Polymerase Bindungsstelle grau unterlegt und die Primer unterstrichen dargestellt.

8.2.5. Template DNA-Sequenz der ArsB ISH-Sonde #41

CTCCGTCTCAGTCCAACGTCTCTGAGATACCTCCAGTGAGACCCACCAACCAAGACTCTCTGGCTTTTTGATATCA
 ATCAGGACCCTGAAGAAAGACACGACGTGTCCCGAGAGCACCCACATCGTCCAGAACCTTCTTTCCCGCCTGC
 AGTACTACCATGAACATTCTGTGCCTTCTCACTTCCCACCCTTGGACCCCGCTGCGATCCCAAGAGCACTGGTG
 TGTGGAGCCCCTGGATG**TAG**GGCTCTGGGGAGTAAGGGGGGCTGGAGCCCATTCTGGGCAGGCTAGACCTCAGG
 CCCCTACTCCCCTGGCTTCTCTTTATCATCCCCACCCTGTCACTGGCCCTCATGCTACATAACCCACCAA
 AGGAGTCCAATTTCAACCCACAGTACATTCTAAAAGCCAGTAAAATCTGGAAGGATCTTGCTGTTGGCaaggcg
 aattcgcgccgctaaattcaattcg**ccctatagtgagtcgtatta**caattc**actggccgctcggtttacaacgtc**
g

ArsB ISH-Sonde #41: PCR-Produkt mit ArsB-F und M13-21-fwd Primer (unterstrichen) vom Plasmid (ArsB-3'UTR clone #5). Die *Mus musculus* ArsB (Arylsulfatase B) DNA-Sequenz (443 bp) ist in Großbuchstaben, die pCR4-TOPO Vektor Sequenz in kleinen Buchstaben, das Stopcodon dick gedruckt, die T7-Polymerase Bindungsstelle grau unterlegt und die Primer unterstrichen dargestellt.

8.2.6. Template DNA-Sequenz der ArsC ISH-Sonde #04

taatacgactcactataggggaattttggccctcgaggccaagaatttcggcacgaggCGCCACGGCGATGGAAGCC
ACGCCCACGACGACCCAGGCCACGCCCAGGACAGAGGCGATGACGACGCCCCTACGGAGGCCACGCCCACGACA
CGGACTCAGGCCACGCCCACGATGAAGCAGGACACGCCCACCGCGATGCAAGCCACGCCCACGATGAAGCAGGAC
ACGCCCACCGCGATGGAAGCCACGCCCACGGCTACGGAGGCCACGCCCAGGACAGACTCGATGACGCCGCCACT
ATAGAGGCCACGCCCACCACGACCCAAGCCACGCCCAGGACACAGGCCACGCCCACAACGATGAAAACACGCCC
ACGACTACGAAGGCGACGCCCACGACACGGACTCAGGCCACGCCCACCCCGACACTGGCCACGCCCACGACATAG
GCGATGACTTCACCCGAAATCACCAGGACGGAGGCCACGCCCACCGGACTGAACTCTGACTCCTGAGCCAAGTCA
AAGGTCGCCACCCCGTGACCCGACCCTGAGCCCCGCCCCCACCAGTGAATGAAGGGACGATGACGTCATCGCCA
TCCCCAGCCCCGCCCACCGCTCAGTGTTAAACCAATAAAGGCGCGAAGCTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAccttgcgccgcgaagcttat~~tccttttagtgaggggtta~~

ArsC ISH-Sonde #04: PCR-Produkt mit T7-Primer und T3-Primer (unterstrichen) vom Plasmid (IC 1381235). Die *Mus musculus* ArsC (Arylsulfatase C) DNA-Sequenz (622 bp) ist in Großbuchstaben, die pT7T3-Pac1 Vektor Sequenz in kleinen Buchstaben, das Stopcodon dick gedruckt, die T3-Polymerase Bindungsstelle grau unterlegt und die Primer unterstrichen dargestellt.

8.2.7. Template DNA-Sequenz der ArsE ISH-Sonde #43

CTTCCTGTGGGACCGGAAGTGGCATCAGGTGGCCGCCCCAGGGGGTTGTGGGCGTCACAGGAAGTGGGGGAGCCC
CAGGCGTGGGGGTTCGTTGGAAACAGGAAGTGAACCGAAAGTGGGGGGCGGGACCGGAAGTGGAGGGTTCTGGAG
GCGGGGATGGGAAGTGGGGTCGGGGGCGGGGTCCCGCTGAGATTTCTTGGGGGCTGTGGTGTGATTGGGGAGT
AGGGGGCGGACTTCTGTGTTTCAATGAAGTGAagggcggaatttcgtttaaacctgcaggactag~~tccttttagtga~~
~~gggttaattctgagcttggcgtaatacatggtcatagctgttccctgtgtgaaattgttatccgct~~

ArsE ISH-Sonde #43: PCR-Produkt mit ArsE-F und M13-rev Primer (unterstrichen) vom Plasmid (ArsE-3'UTR clone 8AA). Die *Mus musculus* ArsE (Arylsulfatase E) DNA-Sequenz (256 bp) ist in Großbuchstaben, die pCR4-TOPO Vektor Sequenz in kleinen Buchstaben, die T3-Polymerase Bindungsstelle grau unterlegt und die Primer unterstrichen dargestellt.

8.2.8. Template DNA-Sequenz der ArsG ISH-Sonde #16

GACATCGCTGATGACAACAGCTCCCGAGCAGACTACACTCAGGATCCTTCAGTGATTCTTCTGCTGTAACCCCTAT
CAAACCTACCTGCCGTTGCCAACCGGTCTGAGGGCTCATTGTTCCCCCATGAGAAACACTACCTGAAAACCTGTAG
ACAGGTGGGTTTACTTCCAACTTGGGTGTGGTCATGGATGTCTGCTTTAGAAAGGAAGCTGCAGCATTTGGTTA
GAAAGCAACGGCGTTACCTCTGTGTGTGTGGACTGTCTCTCTGCATGCAGACTTGAGAAGCCCTGAGTGCTGGT
ACAGTGGACACGGCATGGTTAAGCACTAGCGAGTAATGGGGTCAGGTCTGAGCCCTGGGTTTAAAGCTCAGGCAA
TGCCTTAAACCTCAATTGCAAGTTGAAGGTTAAAGTAACCCACGAAACTGTGTGTAACCCACGAACTGACACCAG
GCAGATTCTCGATCGGTATTTTAGTTTCTATCTCGTGTCCCCAGTTTCAGGGGCCATTTTGGCACAGACTCGTCT
GGTTTGCTGGTGGGTAGGGGTCCGGGAGCCTACACTGTTGCCTTTGAGATGACTTGAGCAAGCTAAACCAAAGTG
AGGTTTTCCAGGCCTTGGACCCCTTCTCTCTGTAAATGTCAAGTGGATGTATTATAAAGATGTAAGCATTCAGG
GCTGAAGTGGTGGCCCGTTGGTTAAGAGCTTGGCCCACTTGCTCAGTTCACGACCTACATGGTAGCATAACT
GTCTGCAACTCTAGCTCTAGGGGAACCTTGTCCTTCTCTGCGCTCTGAGAATGCCAGACACACACGTGGTGT
TATACATGTAGGTAAACACTCATATATTAACCACTACTCTTTTCAAAAAAATTGGGATTTCTTCCAGCCCCTA
AACTTCTAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAagggcggcgctctagagtatccctcgagggggcccaagcttacgcgtacc
cagctttcttgtacaaagtgggt~~ccctatagtgagtcgtatta~~

ArsG ISH-Sonde #16: PCR-Produkt mit ArsG-F und T7-Primer vom Plasmid (IC 5134725). Die *Mus musculus* ArsG (Arylsulfatase G) DNA-Sequenz (926 bp) ist in Großbuchstaben, die pCMV-SPORT6 Vektor Sequenz in kleinen Buchstaben, das Stopcodon dick gedruckt, die T7-Polymerase Bindungsstelle grau unterlegt und die Primer unterstrichen dargestellt.

8.2.9. Template DNA-Sequenz der ArsJ ISH-Sonde #52

GATTGACAAACGCTCAGCGGGAAATGGGGAAGTGGCCTTGAAAAGGTAGGAGAAGCGGCCAGCAGGAAGAAGGTC
 CCCTCGGCTCAGCCTGTCATTCATCCATAAGCAAGGGGTTCCCTTGGGGCAACTTGGCAAGGCTTCCCGGGTGCCT
 GGAACACTGGACCGATGTCAGTCCCACCACGCCTGGTGCCTGCCTGCGCATGGACACAGTCCTGCTCCCCGAAGA
 TGTGGAGGATGATATGACTGCCAGACGTTCTGTCTGTGTGGCTCTCAGTCCCTTTCTTGTCTTGTATTATTTT
 TATTATTTCTTCGTGAGAACTTTTGGGTGAAGATGCTTACTTTTTTTTTCTTTCCTGCAAGCTGCCGGGTGATGT
 TAGGAGGTAAAAGAAAAATTGAAAAGTAAAGAACTGCAAGTCAGTGAAGAGGACATCTGCTCCCTTCTAGTTTTT
 CCAGCGTTCATGAGTTAACTGTTACCTCCAGAGGATTGAAGTTGTGGGAAGTGGTGGCATCTGGGGAAAGGGAGC
 AGGATTCCTTCGCAGCCTTCCTTCAGCTGTCTCTACCCCTTCGCATGTATGAGTGGACCAGCAGCAGCAAAGGGG
 GCAGGGTTCTGCTTGTGGAGTCTCCTGTGGGACCAGAGTGAATGGaagggcgaattcggtttaaacctgcaggact
 agtcccttttagtgaggggttaattcttgagcttggcgtaaatcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatc
 cgct

ArsJ ISH-Sonde #52: PCR-Produkt mit ArsJ-F und M13-rev Primer (unterstrichen) vom Plasmid (ArsJ-5'UTR clone C). Die *Mus musculus* ArsJ (Arylsulfatase J) DNA-Sequenz (645 bp) ist in Großbuchstaben, die pCR4-TOPO Vektor Sequenz in kleinen Buchstaben, die T3-Polymerase Bindungsstelle grau unterlegt und die Primer unterstrichen dargestellt.

8.2.10. Template DNA-Sequenz der ArsK ISH-Sonde #20

CTCAGACCATGGAGAGATGGCTATGGAACACCGCCAGTTTTATATAAAATGAGTATGTATGAAGCTAGTGTCCATGT
 TCCTCTTCTGATGATGGGACCAGGAATTAAGGCCAACCTACAAGTACCAAGTGTGTTTCTCTTGTGGATATCTA
 CCCTACTATGCTTGACATTGCTGGGATTGCTCTGCCTCCAAATCTGAGTGGATACTCCTTGTTGACACTGTTGTC
 AAATGCATCTGCAAATGAACAGGCATTCAAATTCCACCGTCCACCTTGGATTCTGAGTGAATTCCATGGATGCAA
 TGCAAATGCTTCTACCTACATGCTACGAACTGGCCAGTGGAAGTACATAGCCTACGCTGATGGTGTCTCCGTGCA
 GCCTCAGCTCTTCGATCTTTCTTGGATCCGGATGAGCTAACAAACATTGCTACAGAATTTCCAGAAATTACTTA
 TTCTTTGGACCAGAAGCTTCGTTCTATTGTAACTACCCTAAAGTGTCTGCTTCTGTCCATCAGTACAATAAAGA
 ACAGTTTATCATGTGGAAGCAAAGCGTAGGGCAAATTAATCAATGTTATAGCACACCTCAGATGGCATCAAGA
 TTGGCAGAGAGATCCAAGGAAGTATGAAAATGCAATCCAACATTGGCTCACAGCCCACTCCAGTCCACTGGCTAG
 CAGCCCAACCCAGTCCACCAGTGGCTCACAGCCTACTCCAGTGACCAGTGACTCATAGCCCACTCTTCTCCAGTC
 CACCAGTGGTTAGCATCCCACTTCAATCCACCAGTAGCTCACAGCaagggcgaattcggtttaaacctgcaggact
 agtcccttttagtgaggggttaattcttgagcttggcgtaaatcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatc
 cgct

ArsK ISH-Sonde #20: PCR-Produkt mit ArsK-F und M13-rev Primer (unterstrichen) vom Plasmid (ArsK-3'UTR clone 20-1). Die *Mus musculus* ArsK (Arylsulfatase K) DNA-Sequenz (795 bp) ist in Großbuchstaben, die pCR4-TOPO Vektor Sequenz in kleinen Buchstaben, das Stopcodon dick gedruckt, die T3-Polymerase Bindungsstelle grau unterlegt und die Primer unterstrichen dargestellt.

8.2.11. Template DNA-Sequenz der Galns ISH-Sonde #13

GTAACCAGGCTGTCATGAATTGGGCACCCCCAGGCTGTGAAAACTAGGGAAGTGTCTGACACCTCCTGAGTCTG
 TCCCTGAGAAGTGTCTTCTGGGCCCAT**TAG**CCAAGACCAGAATCTCCAGCCAGCCCTGCAAGTGCCTGGGAGACCT
 TGTCTTTCGGACTGATGAATGGAAGAGACCAGCTGCCCTCTGCCCCACCCATCCCTGCATGGACGGCCCCCTGCAAC
 CAGGTGCAAGGCTCCAAGACTGCTCATCCTGGAGCCCTGACCCTGTAGTCCGCTCTCGAGCACCACAGCCCATCT
 TGCCAACTGGCTCCTGAAAAGGAAGCCGGGGCCTTGATCACCGTAGGTACGTCAACCCAGGGTCTGAAGCACTGT
 CACTGTCCCTGCATACATTTCAACCTAGGTGCCGTACACAAAAGTGAAGATTTTCAGCGAAATGCCAAGGAAGTGC
 CATCTATCTGGCTTCTCCCCCAGGCCAACCCCTTTGAGCCACCCTACCTCTTTTGCACTGGCTACAAACAAAAGAC
 AAAGACAGCACCTTTTCCAGTCAAGGTGGCATCTGCACTGCCCCATGGAGATGGGAAGATGACAGCCTAAGTTTC
 TGGCCCTGGCTCAGGGCAGTATGGGGCCACTTCTGTAACCTGCCACCTCTCATGTGCTCCACATAATCTCCAAGA
 CCCTTTCTCTGAAGGCTCATGGGAGCTGTCCGCCATGGACAAGTTTTACATCTGTGCAGTAACTGCAGAGCCAA
 GGTTGAGCTGTAACGGTTGGGAAATGATGGTGAAGAGACTGAGAGGAAGAATAAAGGAACAGGAGGGGGGTTAGC
 TCTGGTAGCCCCAAGTCTATTTTTGGGTTGGTTGGTTGGTTTGGAGACAGGGTTTCTCTGTGAGGTGCTGGCTCTC
 CTGGAATTTCAGTCTGTAGGACAGGCTGGCTTTGAACCTCAGAGATCTGCCTGCCTCTCTTGGGAGTGCTGGGATTA
 AAGGCGTGCGCCATCATGAGACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAagggcgggcgctctagagtatccctcgagggggcccaag
 cttacgcgtaccagctttcttgtacaaagtgggccctatagtgagtcgtatta

Galns ISH-Sonde #13: PCR-Produkt mit Galns-F und T7-Primer (unterstrichen) vom Plasmid (IC 3492664). Die *Mus musculus* Galns (Galactosamin (N-Acetyl)-6-Sulfat Sulfatase) DNA-Sequenz (1013 bp) ist in Großbuchstaben, die pCMV-SPORT6 Vektor Sequenz in kleinen Buchstaben, das Stopcodon dick gedruckt, die T7-Polymerase Bindungsstelle grau unterlegt und die Primer unterstrichen dargestellt.

8.2.12. Template DNA-Sequenz der Gns ISH-Sonde #54

GCGTCAGAACGAGAAGGTTCTCGAAGCATCCGCTC**TAG**CAGCCTCTGCGTTGGATCCTTGCACAGCCTTTTCCGG
 TGCCGTGGTTGGAGTGGGAGCCACGCCTCGGGAGCTCTGGCCTTGCTCTTTCAAGTCTTGTTTGAATAATC
 CAGTCAGCTGACTTCCAGTACTGTGAATCCGCCCTGTGAGAAGTGGCTGACCCTGTTTCTCCTCAGATGACAAC
 CACCACTCCTGAGGTCTTTGTCTCTCCTTGTCCCTTCATCTTGGCTGGGCACAGTATATGAGTCCCCACGTGGT
 CGAGTCTGGATCTGTAAACTCTTCTGATAATGGCAATACTTTAGGGCAGAGATAAAACCTTTTGGTATTTTAGC
 TAGCCCCCAAATCAAAGCACTGTATAGCATTTACACCGAGCCCCCTACCAAACTCACACAGTTGCGAGAAGA
 GCTGCTGTCTGTGGACACGTAGAGAAAGGACATTCATGACATCCCTGTGGTGTGGTTAATGTGCGACGTGTCGCC
 CAAGCTCTGCCCTAAGAAGCTTCTTAGTGACTCCAGCCACCTGAGAGCGCCCAGGAGCACCAGGGGGGGCCAGAT
 GCGCTTCCTGAGCTCTTGGATCAGTGCGCTGAAGGGCCGCACTTACAAGTGCCTGTCTGGAGGGTTCTCAAGTGT
 CAGCGCCACACAAGTCATCCTGCCTGGCTGCAGTTAGCTGTGATTGTCATTGAAAACTTAGTGTCTCCTGGTGG
 AGGGGAAGGACCGGCTGCCTCACCCCACTCCCTGATCTCACAAAAGTGCAGAGTTTCCAGTCTGACTAACTAGGG
 CTCCAGTCAGTATTTCCCTGGCCGGCTTCCCAGATGCCCTGGACGGCACTCTGTTCCCTAAAGTCCAGTTCCACC
 CTGACGTCCACAGAGGCAGCACGGAGTGGCGAAACTCGGTTCCAGaagggcggaattcggtttaaactgcaggact
 agtcccttttagtgaggggttaattcttgagcttggcgtaaatcatggtcatagctgttccctgtgtgaaattggtatc
 cgct

Gns ISH-Sonde #54: PCR-Produkt mit Gns-F und M13-rev Primer (unterstrichen) vom Plasmid (Gns-3'UTR clone E). Die *Mus musculus* Gns (Glucosamin (N-Acetyl)-6-Sulfat Sulfatase) DNA-Sequenz (945 bp) ist in Großbuchstaben, die pCR4-TOPO Vektor Sequenz in kleinen Buchstaben, das Stopcodon dick gedruckt, die T3-Polymerase Bindungsstelle grau unterlegt und die Primer unterstrichen dargestellt.

8.2.13. Template DNA-Sequenz der Ids ISH-Sonde #03

attaacccctcactaaaggggaataagcttgccggccgcCTATCTGGCGGCAGCTTAGCTTCAGCTTGTGCTAGGCT
 CCTTCTGCATCGCCCTGGAGTCCGCAGCGCAAGGCAACTCTGCTACAGATGCTCTGAACATCCTTCTGATCATTG
 TGGATGATCTCCGCCCTCCCTGGGCTGTTATGGAGACAAGCTAGTGAGGTCCCCGAACATTGACCAGCTGGCAT
 CCCATAGCGTTCTCTTTTCTCAGAATGCCTTTGCTCAGCAAGCAGTGTGCGCACCAAGTCGAGTGTCTTCTCACC
 GGAGGAGGCTGACACCACCCGCTGTATGACTTCAATTCTACTGGAGGGTACATTCTGGAAATTTTCCACCA
 TCCCCCAATACTTCAAGGAGAATGGCTACGTGACCATGTGCGTTGGGAAAAGTCTTTTACCCTGGTATATCTTCCA
 ATCAGAGTGATGATTATCCATATAGCTGGTCTTTTCCACCTTATCATCCATCCTCAGAGAAAATATGAAAACTA
 AGACGTGTAAGGGACAAGATGGAAAACCTCCACGCCAATCTGCTTTGTCTGTGATGTGGCAGATGTGCTGAA
 GTACCTTGCCTGACAAACAGAGCACAGAAGAAGCCATCAGGTTGTTGGAAAAGATGAAGACATCAGCTAAGTCCT
 TCTTCTGGCAGTTGGGTACCACAAGCCGCATATCCCTTTCAGATACCCCAAGGAATTTTCTCAGAAGTTGTATCCCT
 TGGAAAACATAACCTTGGCTCCTGATCCCCATGTTTCTGATAGCCTACCACCTGTAGCCTACAACCCCTGGATGG
 ATCATCAGGAGAGGGAAGATGTCCAAGCCTTAAACATCAGTGTTCCCTATGGACCAATTCCTGAGGATTTTCAGC
 GGAAAATCCGCCAGAGCTACTTTGCTTCTGTGTCTTATTTGGATACTCAGGTTGGACATGTTTGTAGTGCTTTGG
 ATGATCTTCGTTTAGCCCAACAACAATTATTGCTTTTACATCTGATCACGGATGGGCCCTAGGTGAACACGGAG
 AATGGGCCAAGTACAGCAACTTTGATGTTGCTACCCGTGTGCCCCTGATGCTCTATGTCCCTGGAAGGACGGCCC
 CACTTCTGCGGCAGGCCAGAAGCTCTTTCCATACCGGGACCCCTTTGATCCGGCCTCGGATTGGATGGATGCAG
 GCAGGCACACCGAGGACCTCGTAGAAGTTGTATCTCTTCCCCACGCTCGCTGGACTTGCAGGACTGCCAGTTC
 CTCCTCGGTGCCCCATCCCTTCTTTTTCATGTTGAGCTTTGCAGAGAAGGCCAGAATCTTCAGAAGCATTTCAGC
 TCCATGACTTGGAAAGAGGAGCCAGACTTGTTTGGTAATCCCCGGGAGTTGATCGCCTATAGCCAGTACCCCGGC
 CTGCAGATTTCCCTCAGTGGAATTCTGACAAGCCAAGCTTAAATGATATAAAGGTCATGGGATATTCTATACGCA
 CTGTAGACTACAGGTACACTGTGTGGGTTGGCTTCGATCCcctcgtgccgaattcttggcctcgagggccaaatt
 ccctatagtgagtcgtatta

Ids ISH-Sonde #03: PCR-Produkt mit T3-Primer und T7-Primer (unterstrichen) vom Plasmid (IC 3025090). Die *Mus musculus* Ids (Iduronat-2-Sulfatase) DNA-Sequenz (1504 bp) ist in Großbuchstaben, die pT7T3-Pac1 Vektor Sequenz in kleinen Buchstaben, die T7-Polymerase Bindungsstelle grau unterlegt und die Primer unterstrichen dargestellt.

8.2.14. Template DNA-Sequenz der Sgsh ISH-Sonde #18

GGAGCAATGGAGGCAGTACCAACAGCTGCACCTTCTACATACCCATCCTAGGAGGCCCTCTACCATATGGGATG
 CCACTCCCGCCTCCTGTAGAGGACACTCAAGCACGCACTCCCTAGTTGCTGCCATACCAAGGACACCGTTGTCT
 CATGTCTGCCTGTCTGGCTCAGGAGACTCTAGGGGGAACCTCGGGCATGGCAGAACCCCAAGTTTGTAGAGTGA
 GTTTGGAGATCTGCAGATGGAGGAGCAGGGTCTGGGGCTCGAAGCCCTCTGGTTTCGGGAACCTGTGGATGTTTT
 CAAGCCCTTACCCTAAGAGGAGCTCAGGTTTCTGGGTGCCACATGGGCAGTGGGCAGACCGCACTGACTACTTC
 AACCAACCTTGTCTGGAGAGAGCATTAGTAGGCCTTGAGCTTGCTTCCGCCTCCATGCTCCCCCCTGAGGTA
 CATGCTTAGCCAGGGTTCATGCTGTTCTCAGAGGAGTGAGTTTGATCCTGTGGTCTATCTGGGCTCTGaagggcg
 aattcgttttaaacctgcaggactagtcccttttagtgaggggttaat

Sgsh ISH-Sonde #18: PCR-Produkt mit Sgsh-F und T3-Primer (unterstrichen) vom Plasmid (Sgsh-3'UTR clone 18-4). Die *Mus musculus* Sgsh (N-Sulfoglucosamin Sulfohydrolase) DNA-Sequenz (518 bp) ist in Großbuchstaben, die pCR4-TOPO Vektor Sequenz in kleinen Buchstaben, die T3-Polymerase Bindungsstelle grau unterlegt und die Primer unterstrichen dargestellt.

8.2.15. Template DNA-Sequenz der Angpt1 ISH-Sonde #85

GTTGGTGGTTCGATGCCTGTGGCCCTTCCAATCTAAATGGAATGTTCTACACTGCGGGACAAAATCATGGAAAAAC
TGAATGGGATAAAGTGGCACTACTTCAAAGGGCCAGTTACTCCTTACGTTCCACCACCATGATGATCCGGCCCT
TGGACTTTT**TGA**AGGTGCTCTGCCAGTATTAGAAAGCTGCAAAGAAAGCTGGGCATGTTCCAGATGAGAAGCTAG
TCAGAGGCTTCAGAAACAACCAACATTGTCTCCATTCCAGCAGCAAGTGGTTATGTCATGTCACCTGGGTTTGA
GCCTTCTGAGGTCAACAGAATCGCCACTTGGGTCCAGAGAATGCCACTCACAATCATGTTTAAAAGGGAAGAAAC
TTCTCAGCTTGCTGCACTTCAAAGTGCTACTGGATCACATTCTGAGCTTATAACATCCTGATGCTGAATGCAACT
TGTTTCATGTAAAAGCAAAAGAAGAAGAAACAGCAAATGGGAACAGGCTTTCCAGAATCTGTTGAAGATGGATTG
TGGAGGTGACCTGGTATCACTGTAGGAAATCCTGCTAACAATACATCACTGCCCCAAAAGAGACATAAAAGAAAAGT
TTTGTCTACTGAGTTGGCTAAAAGTTAGTGGAGTTCACCTGCCCATTTCCAGTATCATATTTACTAGCTGATTTT
AGGTTTCTCTGTGTTCAAATGTAAACTCTGTTCTTGTAAAGCCATGATACAATATAGTACATGGAGGATAAGAGTTG
GGGGTAGAAGaagggcggaatttcgtttaaacctgcaggactag**tccttttagtgaggggttaat**tctgagcttggcg
taatcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgct

Angpt1 ISH-Sonde #85: PCR-Produkt mit Angpt1-F und T3-Primer (unterstrichen) vom Plasmid (Angpt1-3'UTR clone A). Die *Mus musculus* Angpt1 (Angiopietin 1) DNA-Sequenz (760 bp) ist in Großbuchstaben, die pCR4-TOPO Vektor Sequenz in kleinen Buchstaben, das Stopcodon dick gedruckt, die T3-Polymerase Bindungsstelle grau unterlegt und die Primer unterstrichen dargestellt.

8.2.16. Template DNA-Sequenz der Eif3s6 ISH-Sonde #86

CCATCCAAAGGGCCGTGATAACATTATTGATCTCTTCTTTACCAACCACAGTATCTTAATGCAATTCAGACAAT
GTGTCCACATATTCTACGCTATTTGACTACTGCCGTCATAACCAACAAAGATGTGCGGAAACGCCGGCAGGTGCT
GAAAGATCTGGTGAAAGTGATTCAACAGGAGTCTTACACATATAAAGACCCAATTACAGAATTTGTTGAATGCCT
ATATGTTAACTTTGATTTTGACGGGGCTCAGAAAAAGCTGAGAGAATGTGAATCAGTGCTCGTGAATGACTTCTT
CCTGGTAGCGTGTCTGGAGGACTTCATTGAGAATGCCGCTCTCTTCATATTTGAGACGTTTTGTGCTATCCACCA
GTGTATCAGCATTAATATGTTAGCAGACAACTGAATATGACTCCAGAAGAAGCTGAAAGATGGATTGTGAATTT
GATTAGAAATGCGAGGTTGGATGCCAAGATTGATTCTAACTAGGTCATGTGGTAATGGGCAACAATGCAGTCTC
GCCCTACCAGCAAGaagggcggaatttcgtttaaacctgcaggactag**tccttttagtgaggggttaat**tctgagctt
ggcgtaatcatggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgct

Eif3s6 ISH-Sonde #86: PCR-Produkt mit Eif3s6-F und M13-rev Primer (unterstrichen) vom Plasmid (Eif3s6-cp clone A). Die *Mus musculus* Eif3s6 (Elongationinitiation factor 3 subunit 6) DNA-Sequenz (747 bp) ist in Großbuchstaben, die pCR4-TOPO Vektor Sequenz in kleinen Buchstaben und die T3-Polymerase Bindungsstelle ist grau unterlegt dargestellt.

8.2.17. Template DNA-Sequenz der Rspo2 ISH-Sonde #78

GTGCACAAAGCTACTCTCCAGTCCACACTGGTGGACAGCATTCCTGATCCTCTGACCAGTATCCATTTTCAGTAA
TGCTGCAGAGGGAGGTGCCCAAGCATGGACTCAGCGTTATTTATGCTTTGATTGGAATCTGGGGCCTGTGATGGC
AGGAGCTTGTTGAGCTGAGTCAGCGGGAGCTGATGCATCTGTACTCTTGTGATGAGCACAGTGTGTCATAAGAAC
CTGTCCCTGGCACGGTGGACCCACAGGAGGCACAAGGCTGTAGATCACCACCAGAGAATGCACCTGTGCCTATTT
TGATGGATGGCAATGCTAAGCAAGCAAGCACTGTTCACTTGTGACTTTTCATTTCTCACACTGTGCACTGTCAAAG
ACAAATGTGCATGGAAAAATGTTTAGTGTACCTCATGGCGTTCTCAGCATCAGTGACCTTCAAACGGTCTCTACA
ATGAGACTGTGTTCTAGCTAGGGGTATGCTGTGGAAATTCCTGCTACATTTTCATCTTAGTGCTAACATGTACAGA
TTCTGCTGCGTACATTCAAAGCTCATTACTGTATATTTATGCTTTCTCTGTGTAACAAGTTATACCTGATAAGA
TGTCACTTTGTTTCTAGTGGTTCTTAACCATGGTCTGGTATGCTATTCTAGTTTGGAAATTAACAAGTGT
TTGTTGCCTCTGTTTTCTTTTGTTCCTATCATTTTGGCGGGGTGGGGTGGGCTTGATTCTAACCGTAAGaag
ggcgaaatttcgtttaaacctgcaggactag**tccttttagtgaggggttaat**tctgagcttggcgtaatcatggtcat
agctgtttcctgtgtgaaattgttatccgct

Rspo2 ISH-Sonde #78: PCR-Produkt mit Rspo2-F und M13-rev Primer (unterstrichen) vom Plasmid (Rspo2-3'UTR clone 1A). Die *Mus musculus* Rspo2 (R-spondin 2) DNA-Sequenz (747 bp) ist in Großbuchstaben, die pCR4-TOPO Vektor Sequenz in kleinen Buchstaben und die T3-Polymerase Bindungsstelle ist grau unterlegt dargestellt.

8.2.18. Template DNA-Sequenz der Tmem74 ISH-Sonde #79

GCCTTCTCATTGAGGGATTCTGTACAGGAATGTGTGAGTCCCTGGATAAAATTTGGCTTGGTGATGGCAGTGTG
CTCTTCCCAGAGATTCTGCCACTTTCTCCTTGCTCCTTTTCTGCCCTGACCCGAGTTTCTCACTGCTGACCTCAG
TGACAAGTCAGAAGATTTGCCCCCTCCATCATCTTCTGTTCCTGGGTTCCCTTTCCCGTGTTTGTAACCTCTGATG
AGAAACTGAGGCCAAGGTGTCTTCAACCAGCCATGGCTGTAAAGGGAATGAGGACCAGAGGAGCAGGCCTCCCTA
CAGTCCGGGATTAAATTCTGCCAGATTCTTCTTATCTAATTGTGTTGCTGATAGCAAAAGTTTGAAATTTTCGGG
GAGAAATCTATCCAGCTCCCATGGAGCTCCACTCTCTGTCTAAGAGGAACAGCCAGTGGACCCaagggcggaatt
cgcgggcgctaaattcaattcgccctatagtgagtcgtattacaattcactggccgctcggttttacaacgctcg

Tmem74 ISH-Sonde #79: PCR-Produkt mit Tmem74-F und M13-21-fwd Primer (unterstrichen) vom Plasmid (Tmem74-5'UTR clone 2A). Die *Mus musculus* Tmem74 (Transmembran protein 74) DNA-Sequenz (439 bp) ist in Großbuchstaben, die pCR4-TOPO Vektor Sequenz in kleinen Buchstaben und die T7-Polymerase Bindungsstelle ist grau unterlegt dargestellt.

8.2.19. Template DNA-Sequenz der Trhr ISH-Sonde #87

GAGTCCCCGTGTCAGAGAAGCTTCAAGCCACTGAAGATGGAGAATGATACTGTCACTGAAATGAACCAATCCGAG
CTCCAGCCACAAGCAGCTGTGGCCCTCGAGTACCAGGTGGTTACCATCTTACTTGTGGTCATTATTTGTGGACTG
GGCATTGTGGGCAACATCATGGTAGTCCTGGTGGTCATGAGAACAAAGCACATGAGAACCCTACAAACTGTTAC
CTGGTAAGTCTGGCTGTGGCAGATCTCATGGTTCTGGTGGCTGCAGGCCTCCCCAACATAACCGACAGTATCTAT
GGTTCCTGGGTCTATGGCTATGTTGGCTGCCTCTGCATTACATATCTCCAGTACCTAGGCATTAATGCATCTTCA
TGTTCAATAACGGCCTTTACCATTGAAAGGTACATAGCAATCTGTACCCCCATCAAAGCCCAGTTTCTCTGCACG
TTTTCCAGAGCCAAAAAATCATCATCTTTGTCTGGGCCTTCACATCCATTTACTGTATGCTCTGGTTCTTCCTG
CTGGATCTCAACATCAGCACCTACAAAAACGCTGTTGTGGTTTCTGTGGCTACAAGATCTCCAGGAACCTACTAC
TCACCTATTTACCTAATGGACTTTGGTGTCTTTTATGTTGTGCCAATGATCCTGGCCACTGTGCTTTATGGATTT
ATAGCTAGAATCCTCTTCTTAAACCCATTCCaagggcggaattcggtttaaacctgcaggactagtcctcttagtg
aggggttaattctgagcttggcgtaatcatgggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgct

Trhr ISH-Sonde #87: PCR-Produkt mit Trhr-F und M13-rev Primer (unterstrichen) vom Plasmid (Trhr-cp clone A). Die *Mus musculus* Trhr (Thyrotropin-releasing hormone receptor) DNA-Sequenz (707 bp) ist in Großbuchstaben, die pCR4-TOPO Vektor Sequenz in kleinen Buchstaben und die T3-Polymerase Bindungsstelle ist grau unterlegt dargestellt.

8.2.20. Template DNA-Sequenz der Ttc35 ISH-Sonde #88

GCAGGTCGAAGTAAGAAGGAAACCAAATACTCTCTTAAGGCAGTTGAAGACATGTTGGAGACATTGCAGATCACT
CAGTCTTGAGGTTTCAGGAACCCATTTGACGTTAGATTTCAAACCTACACAGTTGAACTTTTGGCCTGTGACTGA
ATTTACTAAATATCTAGTGCTATTTGTATTCTAATTTTCTCTGAAGAGGTTGTTATAAAGAATGTTTAACTAAAC
CTCAGCTTGCCTTGTACTGCTAGGAAGCAGGGAGATGGAGGTAATCCATGGGACAGAGATTTAAGACCTATTGAT
TGTATATCCATCCTCGTATATACCCCTACAagggcggaattcggtttaaacctgcaggactagtcctcttagtgag
gggttaattctgagcttggcgtaatcatgggtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgct

Ttc35 ISH-Sonde #88: PCR-Produkt mit Ttc35-F und M13-rev Primer (unterstrichen) vom Plasmid (Ttc35-3'UTR clone 3A). Die *Mus musculus* Ttc35 (Tetratricopeptide repeat domain 35) DNA-Sequenz (330 bp) ist in Großbuchstaben, die pCR4-TOPO Vektor Sequenz in kleinen Buchstaben und die T3-Polymerase Bindungsstelle ist grau unterlegt dargestellt.

8.2.21. Template DNA-Sequenz der DispA ISH-Sonde #05

```
taatacgactcactataggggaatttggccctcgaggccaagaattcggcacgaggTGCAAGGCCTGGGGACAGGG
GACCAAGCAAAACACATGCCGCCAGTGCCTACAGCGTAGATGCCAGGGGCCAGAAATCCCAACTGGAACATGAGT
TTTACGAGTTACAGCCCCTGGCATCTCACAGCTGCACCTTCCTCGGAGAAGACTACGTACGAAGAGCCACACACCT
GCTCCGAATTTTTTCAACGGCCAAGCAAAGAATTTAAGGATGCCTGTGCCTGCAGCCTACAGCAGCGAACTCACCA
AAAGCCCCAGCAGTGAGCCAGGCTCAGCCTTGCTGCAGTCCTGTCTGGAGCAGGACACCGTGTGCCATTTCTCTC
TCAATCCGAGATGTAAGTCCGAGACGCCTACACACACTTACAGTACGGATTACCAGAAATCCACTGCCAGCAGA
TGGGTGACTCCTTATGCCACAAGTGTGCCTCCACTGCAGGCGGCTTTGTCCAGATTTCAGAATTCGGTGGCACCTC
TGAAGGCCTCACACCAAGCCGCCGAGGGCCTTCTGCACCCTGCCCAGCACATGCTGCCCCAGGGATGCAGAATT
CTCGGCCTAGGAATTTCTTTCTCCACTCAGTGCAGCACTTTCAGGCCCAAGAAAACCTGGGTTCGACCAGCACAC
ACAGCACGGATGAGCGTCTTCCCAGGACAGCAGAGCTGTCACCGCCACCGTCTGACAGCAGGAGCACTGAGTCTT
TCCAAAGAGCTTGTGTCCATCTTGAGAATAACCAAAGGAGACTCTGCAAAAGTAGAGACCCAGGGGACACAGAGG
GCAGTGGAGGACAAAATCCAAGGTCTCTGGTTTACCAAACCAGACTGACGAGGAGGAGAAGCAAGTGGAGCCAA
GCCTGTGTCAGACCGATGAAACTGTGAACCTCAGAACATTTAAATCATAACGAATCAAACCTTTACATTCAGCCATT
TACCAGGGGAGGCTGGCTGCAGGTCTGCCCAAACAGTCCACAGAGTTGTAGAAGCATCATGAGATCAAAGTGC
GGACTGAGGACTGCCAGACGCCAAACCTTGAAGCCAATGTGCCTGTGTACCAACACACTCAGACCTGTCTGGCG
AGAGTCTGTTAATAAAAACACTATAAATAACCCTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAca
gaggcgccgcaagcttattccttttagtgagggttaat
```

DispA ISH-Sonde #05: PCR-Produkt mit T7-Primer und T3-Primer (unterstrichen) vom Plasmid (IC 5058375). Die *Mus musculus* DispA (Dispatched A) DNA-Sequenz (1143 bp) ist in Großbuchstaben, die pT7T3-Pac1 Vektor Sequenz in kleinen Buchstaben, das Stopcodon dick gedruckt, die T3-Polymerase Bindungsstelle grau unterlegt dargestellt.

8.3. DNA-Sequenz der RCAS-ArsI-V5 Klonierungsstelle

ATCGATTCTAGAGCGGCCGCACGTGCAGCCG**ATTTAAAT**CGAT

RCAS-BPA (Swal): Der ursprüngliche RCAS-BPA Vektor enthält eine *ClaI* Restriktionsschnittstelle (ATCGAT) die zur Klonierung benutzt wird (Logan & Tabin, 1998). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten modifizierten RCAS-BPA Vektor ist in die *ClaI* Stelle ein Polylinkerbereich kloniert, der eine Swal Schnittstelle (ATTTAAAT, grau unterlegt) enthält (modifiziert von Dr. J. Hecht, MPI molekulare Genetik, Berlin). Nach Swal Linearisierung und dem Anfügen von T-Überhängen kann dieser Vektor direkt für die Ligation von PCR-Produkten verwendet werden.

ATCGATTCTAGAGCGGCCGCACGTGCAGCCG**ATTT**TATCGCGAGCCACC**ATGCATGCTCTC**...

... **ArsI CDS** ...

... **TCCACCGGATC**CCGCGGTTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGGGT**TGA**
AAAATCGAT

RCAS-ArsI-V5 (clone 11): Der Anfang und das Ende der 1719 bp DNA-Sequenz der *Mus musculus* Arsl CDS ohne Stopcodon sind dick gedruckt hervorgehoben (vollständige Sequenz siehe Abschnitt 5.2.1). Das in die Swal (grau unterlegt) Schnittstelle des RCAS-BPA (Swal) Vektors klonierte PCR-Produkt wurde mit den Primern MmArsl-Nrul-F und V5-Stop-R vom Arsl-V5-His Plasmid (Methodenteil 2.1.7.1) amplifiziert. Deshalb befindet sich eine *Nrul* und Kozak Sequenz vor dem 5' Ende der Arsl CDS. Am 3' Ende der Arsl CDS ist der Leserahmen des V5-Epitops und ein Stopcodon (TGA, dick gedruckt) angefügt.

8.4. DNA-Sequenzen der Vektor Integrationsstellen

8.4.1. Sulf1^{gt} XM190 in Intron 1

GTGGACATGGGTGCACAGATACACACAGAGAATCTAATTCAAAATTAAAAAATACTGAACAAATATAAGACTGATGATATATATCTTTAATTCCAGTACTTGGGAGGCTGAGGTATTGTGGagctagcttgggtgcgttggttgtggataagtagctagactccagcaaccagtaacctctgccctttctcctccatgacaaccaggtcccaggtcccgaaaacc
aaagaagaagaacgcagatcgcatcgataacttcgtatagcatacattatacgaagttatcgagatctggactc
tagaggatcccgctcgtttttacaacgctcgtgactgggaaaaccctggcggttaccctaatcgcccttgcagcac
atccccctttcgccagctggcgtaatagcgaagaggcccgaccgatcgcccttcccaacagttgctgcagcctga
atggcgaaatggcgctttgctggtttccggcaccagaagcggtgccggaagctggctggagtgcgatcttcctg
aggccgataactgtc

Sulf1^{gt} Integrationsstellen: Die Sulf1^{gt} Genotypisierung mit den Primern XM190-geno-F1 und XM190-Gt-β-Geo-R1 (dick gedruckt) amplifiziert einen 539 bp Bereich aus der gDNA des mutierten Allels. Die Sequenz des im Genom integrierten Teil vom pGT0lxf Genetrap Vektor ist in kleinen Buchstaben dargestellt. Dies entspricht einem um 1446 bp trunkiertem 5' Ende des pGT0lxf Vektors. Der unterstrichene Teil markiert den verbliebenen Teil der en2-Intronsequenz vom Genetrap Vektors bis zur Splice-Akzeptorstelle.

8.4.2. Sulf2^{gt} PST111 in Intron 3

CGCGTGTTAGAGGTCTCGTAGGCCAGTGCTTCAGATGGTTGGGAAGCCTGGAACGCTGTTGGGGTGGGGATAGGC
AGGGACATAGCAAGGCGGCGGCTCCTATTGGAGagctctggtaccgcactgccggtttcctccaccatccccgcag
cgcagggcagtgcatccgctcctggctgcgaagggggatggctcgggccttctccagcctcttccgcttctagcgg
aaggggccttgatggaagggcccgcatgtctccaaagttgattcatgcttcttgcacagagaaagaccagaaaga
aggtctcaagttttagccggttagcccgatggcctttcctgcacggcaccatatgaaccttgtgaccttgacaaa
gagaccctctaacccaagaccctaccactttaccctttccctttgaaggtttccacaccaccctccacact
tgcccaaacactgccaaactatgtaggaggacgggttgggactaacagaagaaccgctcgtggggaagctgttg
ggagggtcactttatgttcttgcccaaggtcagttgggtggcctgcttctg

Sulf2^{gt} Integrationsstellen: Die Sulf2^{gt} Genotypisierung mit den Primern PST111-geno-F1 und PST111-Gt-980-R1 (dick gedruckt) amplifiziert einen 576 bp Bereich aus der gDNA des mutierten Allels. Die Sequenz des PST111 Genetrap Vektors (pGT1TM-PFS) ist in kleinen Buchstaben dargestellt und entspricht der en2-Intronsequenz des Vektors ab Base 537 in der Ursprungs pGT1TM-PFS Sequenz.

8.4.3. Col2-Sulf1^{tg199} auf Chromosom 15

8.4.3.1. Col2-Sulf1^{tg199} 3'-iPCR

aggtcacagcaggagcacaggtcaaagctcatgccctaagctaggaagaagaggaggaggaggagaccagtgtcc
tacagacccttctgagaacctgtccccgggatccatgtctgagtgcagtgccctcaaaggcttgctcccaggg
tgatgCTTTCATTTTATTTTGTGTGTGAATTCCTGTCTACATATATAGCTGCACACCACACAAATACT**GTAC**

tg199 3'-iPCR: Die 3'-iPCR ergab 70 bp flankierende gDNA Sequenz, die in Großbuchstaben angegeben ist. Die *RsaI* Schnittstelle (222-225 bp) ist dick gedruckt dargestellt. Die Sequenz des Col2a1-Vektors ist in kleinen Buchstaben angegeben. Der nicht unterstrichene Teil davon entspricht dem Col2a1-Sulf1 Konstrukt bis zur Base 10010, während der nachfolgende unterstrichene Teil komplementär zur invertierten Col2a1-Vektor Sequenz 10064-10114 bp ist.

tg199 5'-iPCR: Eine 795 bp gDNA Sequenz wurden durch 5'-iPCR sequenziert und ist in Großbuchstaben angegeben. Der Übergang zum Col2a1-Promotor (ab Base 3686 des Col2a1 Vektors) ist in kleinen Buchstaben dargestellt. Die Schnittstelle für *MfeI* (1-6 bp) ist dick gedruckt. Der Bereich 1-583 bp stimmt mit *Mus musculus* gDNA-Sequenz auf Chr.15 bei 44,12 Mb überein. Der unterstrichene Bereich von 55 bp (578-632 bp) ist komplementär zu einem invertierten Abschnitt auf Chr.15 bei 41,87 Mb. Die kursiv dargestellte Sequenz lässt sich nicht eindeutig zuordnen.

8.4.3.3. Col2-Sulf1^{tg199} 42Mb-iPCR

tg199 42Mb-iPCR: Kleine Buchstaben entsprechen der Ausgangssequenz von Chr. 15 bei 41,87 Mb. Im Vergleich zur C57BL6 Genomsequenz fehlen 1328 bp, inklusive der 55 bp in der 5'-iPCR Sequenz. Große Buchstaben kennzeichnen die neugewonnene Sequenzinformation, die identisch zu Chr.15 bei 88,1 Mb ist. Der unterstrichene Teil ist invertiert und komplementär im Vergleich zur C57BL6 Sequenz. Vorwärtsprimer iPCR-42M-350F und *Hind*III Schnittstelle (649-654 bp) sind dick gedruckt. Die beiden kursiv dargestellten Abschnitte lassen sich keinem Bereich im Genom eindeutig zuordnen.

8.5. Übersicht der Sulf1^{gt} und Sulf2^{gt} Genotypen

Tabelle 8.1: Nachkommen der Sulf1^{gt} und Sulf2^{gt} Mäusezucht

Genotyp der Elterntiere	Alter der Nachkommen	Anzahl Nachkommen	Anzahl Würfe	Durchschnittliche Wurfgröße	Anzahl und Genotyp der Nachkommen							
					S1 ^{+/+}	S1 ^{+/-}	S2 ^{+/+}	S2 ^{+/-}	S1 ^{+/gt}	S1 ^{+/-gt}	S2 ^{+/gt}	S2 ^{+/-gt}
Weiblich	Erwartet				(25)	(50)	(25)					
Sulf1 ^{+/gt} Sulf1 ^{+/gt}	E14-E16	72	9	8,0	16 (22)	38 (53)	18 (25)					
	E17-E18	35	5	7,0	9 (26)	19 (54)	7 (20)					
	1 Woche	24	3	8,0	7 (29)	13 (54)	4 (17)					
	3 Wochen	93	12	7,8	30 (32)	42 (45)	21 (23)					
Sulf2 ^{+/gt} Sulf2 ^{+/gt}	Erwartet				(25)	(50)	(25)					
	E14-E16	93	12	7,8	14 (15)	49 (53)	30 (32)					
	E17-E18	44	6	7,3	13 (30)	16 (36)	15 (34)					
	1 Woche	31	4	7,8	8 (26)	10 (32)	13 (42)					
Sulf1 ^{+/gt} , Sulf1 ^{gt/gt} ; Sulf2 ^{+/gt} Sulf2 ^{gt/gt}	3 Wochen	79	11	7,2	21 (27)	40 (51)	18 (23)					
	Erwartet				(25)	(25)	(25)					
	E10-E12	87	12	7,3		20 (23)	25 (29)	25 (29)	25 (29)	25 (29)	17 (20)	17 (20)
	E14-E16	108	15	7,2		25 (23)	23 (21)	38 (35)	38 (35)	22 (20)	22 (20)	22 (20)
Sulf1 ^{+/gt} , Sulf1 ^{+/gt} ; Sulf2 ^{+/gt} Sulf2 ^{+/gt}	E17-E18	67	9	7,4		19 (28)	14 (21)	15 (22)	15 (22)	19 (28)	19 (28)	19 (28)
	3 Wochen	60	9	6,7		13 (22)	13 (22)	17 (28)	17 (28)	17 (28)	17 (28)	17 (28)
	Erwartet				(6,25)	(12,5)	(12,5)	(6,25)	(12,5)	(12,5)	(6,25)	(6,25)
	E16-E18	42	6	7,0	3 (7)	5 (12)	6 (14)	4 (10)	3 (7)	1 (2)	4 (10)	2 (5)
Sulf1 ^{+/gt} , Sulf1 ^{+/gt} ; Sulf2 ^{+/gt} Sulf2 ^{+/gt}	3 Wochen	200	26	7,7	16 (8)	35 (18)	31 (16)	52 (26)	8 (4)	10 (5)	16 (8)	23 (12)
												9 (5)

Einzel- und doppel-homozygote Sulf1;Sulf2 Genetrap Mutanten werden mit normaler Häufigkeit, wie nach Mendel erwartet, sowohl Embryonal als auch 3 Wochen nach der Geburt generiert. Die Werte in Klammern sind Prozentangaben.

9. Verzeichnisse

9.1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ (als Präfix)	mikro
3'UTR	<i>3 prime untranslated region</i> (nicht-Proteinkodierende DNA-Sequenz am 3' Ende eines Gens)
5'UTR	<i>5 prime untranslated region</i> (nicht-Proteinkodierende DNA-Sequenz am 5' Ende eines Gens)
Abb.	Abbildung
AER	<i>apical ectodermal ridge</i> (apikal ektodermale Randleiste)
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMP	<i>Bone morphogenic protein</i> (Genname)
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
cDNA	<i>copy DNA</i> (zu mRNA komplementäre DNA)
CDS	<i>coding sequence</i> (Proteinkodierende DNA-Sequenz eines Gens)
CO ₂	Kohlendioxid
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Zellkulturmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	<i>expressed sequence tag</i> (ansequenzierter cDNA-Klon)
et al.	et alteri
FCS	<i>fetale calf serum</i> (fötales Kälberserum)
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Genname)
gDNA	<i>genomic DNA</i> (genomische DNA)
Gt	Genetrap
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> (Genname)
HS	Heparansulfat
IC	IMAGE clone
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
IHH	<i>Indian hedgehog</i> (Genname)
k (als Präfix)	kilo
m (als Präfix)	mili
M	Molar

min	Minuten
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten RNA)
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NP40	Nonidet P40
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS mit Tween 20
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
Primer	Oligonucleotid für PCR- bzw. Transkriptionsreaktion
PTHrP	<i>Parathyroid Hormone related Protein</i> (Genname)
qPCR	Quantitative PCR
qRT-PCR	Quantitative RT-PCR
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RT-PCR	<i>reverse transcription PCR</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
SSC	<i>standard saline citrate</i>
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
WISH	<i>whole mount ISH</i> (ISH an ganzen Embryonen)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Einbuchstabencode der Aminosäuren:

A	Alanin (Ala)
C	Cystein (Cys)
D	Asparaginsäure (Asp)
E	Glutaminsäure (Glu)
F	Phenylalanin (Phe)
G	Glycin (Gly)
H	Histidin (His)
I	Isoleucin (Ile)
K	Lysin (Lys)
L	Leucin (Leu)
M	Methionin (Met)
N	Asparagin (Asn)
P	Prolin (Pro)
Q	Glutamin (Gln)
R	Arginin (Arg)
S	Serin (Ser)
T	Threonin (Thr)
V	Valin (Val)
W	Tryptophan (Trp)
Y	Tyrosin (Tyr)
X	beliebige Aminosäure

Einbuchstabencode der Nukleotide:

A	Adenosin
C	Cytidin
G	Guanosin
T	Thymidin
R	A oder G (puRin)
Y	C oder T (pYrimidin)
K	G oder T (Keto)
M	A oder C (aMino)
S	G oder C (Strong) drei Wasserstoffbrücken
W	A oder T (Weak) zwei Wasserstoffbrücken
N	beliebiges Nukleotid (aNy)

9.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Makro- und mikroskopischer Aufbau des Skeletts der Maus.....	1
Abb. 1.2:	Schematische Darstellung der chondralen Osteogenese.....	3
Abb. 1.3:	Molekulare Regulation der Chondrozyten-Differenzierung.....	5
Abb. 1.4:	Heparansulfat-Proteoglykane und HS-Biosynthese.....	10
Abb. 1.5:	Beispiele für Signalweg-Aktivierung bzw. -Inhibierung durch Sulf1.....	14
Abb. 2.1:	Funktionsprinzip der Genetrap-Mutagenese.....	28
Abb. 2.2:	Schema der inversen PCR.....	30
Abb. 3.1.1:	Genstruktur und Verwandtschaftsverhältnisse der Maus-Sulfatasen.....	41
Abb. 3.1.2:	Expressionsmuster der 14 Sulfatasen an parasagittal Schnitten von E12,5 und E14,5 Maus-Embryonen.....	43
Abb. 3.1.3:	Expression von Sulfatasen in der Kopfregion von E14,5 Embryonen.....	44
Abb. 3.1.4:	Expression von Sulfatasen in den embryonalen Augenanlagen.....	45
Abb. 3.1.5:	Expression von Sulfatasen im embryonalen Knorpel und Knochen.....	46
Abb. 3.1.6:	Doppel-Färbung von <i>Ihh</i> mit <i>Ptch1</i> , <i>Disp1</i> , <i>Ars1</i> , <i>Sulf1</i> und <i>Sulf2</i>	47
Abb. 3.1.7:	<i>Ars1</i> -, <i>Sulf1</i> - und <i>Sulf2</i> -Expression bei E9,5 bis E14,5 Embryonen.....	48
Abb. 3.1.8:	<i>Sulf1</i> und <i>Sulf2</i> sind teilweise überlappend in den Kieferbogen- und Bein-Anlagen exprimiert.....	49
Abb. 3.1.9:	Detaillierte Expressionsanalyse von <i>Sulf1</i> und <i>Sulf2</i> im Knorpel.....	51
Abb. 3.2.1:	Alternative Spleiß-Formen, Genstruktur und Lage der Genetrap-Insertion im <i>Sulf1</i> - und <i>Sulf2</i> -Gen.....	52
Abb. 3.2.2:	Die β -Galaktosidase Färbung der Genetrap Mutanten entspricht dem <i>Sulf1</i> bzw. <i>Sulf2</i> Expressionsmuster.....	53
Abb. 3.2.3:	Stark verminderte <i>Sulf1</i> - und <i>Sulf2</i> -Expression in Genetrap-Tieren.....	54
Abb. 3.2.4:	Quantifizierung der <i>Sulf1</i> - bzw. <i>Sulf2</i> -Expression bei Mausmutanten.....	55
Abb. 3.2.5:	Die <i>Sulf1</i> ^{gt} und <i>Sulf2</i> ^{gt} Mutationen beeinflussen nicht die Expression anderer Sulfatasen und 6-O-Sulfotransferasen.....	56
Abb. 3.2.6:	Evaluation der Spezifität von <i>Sulf1</i> - und <i>Sulf2</i> -Peptid-Antikörpern.....	58
Abb. 3.3.1:	Verkleinertes Skelett bei <i>Sulf1</i> ^{gt/gt} ; <i>Sulf2</i> ^{gt/gt} Doppelmutanten.....	62
Abb. 3.3.2:	Veränderungen im Sternum bei <i>Sulf1</i> ; <i>Sulf2</i> Doppelmutanten.....	64
Abb. 3.3.3:	Skelettveränderungen an Wirbeln und Schädelbasis.....	67
Abb. 3.3.4:	Verkürzte Zone der proliferierenden Chondrozyten bei E16,5 Radii.....	68
Abb. 3.3.5:	Zelldichte und Proliferationsrate bei E16,5 <i>Sulf1</i> ; <i>Sulf2</i> Mutanten.....	69
Abb. 3.3.6:	Unveränderte Expressionsmuster der Chondrozytenmarker <i>Col10a1</i> , <i>Ihh</i> , <i>Ptch1</i> bei E16,5 Radius bei <i>Sulf1</i> ; <i>Sulf2</i> Doppelmutanten.....	70
Abb. 3.3.7:	Veränderungen in der Chondrozyten Population im Sternum.....	72
Abb. 3.4.1:	Agnathia Phänotyp bei <i>Shh</i> ; <i>Sulf1</i> ; <i>Sulf2</i> Dreifachmutanten.....	74
Abb. 3.5.1:	Schema des linearisierten <i>Col2a1</i> -Sulfatase-Expressionskonstrukts.....	75

Abb. 3.5.2: Skelettveränderungen des direkt injizierten Col2-Sulf1 Embryo #2.	77
Abb. 3.5.3: Skelettveränderungen der Col2-Sulf1 ^{tg199} Mauslinie.....	78
Abb. 3.5.4: Überprüfung der Sulf-Überexpression bei vier transgenen Linien.	80
Abb. 3.5.5: Col2-Sulf1 ^{tg199} - Ergebnisse der 3'- und 5'- inversen PCR.	81
Abb. 3.5.6: Col2-Sulf1 ^{tg199} - Ergebnis der 42Mb inversen PCR.	83
Abb. 3.5.7: Col2-Sulf1 ^{tg199} - Modell der Transgen-Insertion auf Chromosom 15.....	83
Abb. 3.5.8: Quantitative Bestimmung der gDNA-Menge bei tg199-Tieren.....	84
Abb. 3.5.9: Expressionsmuster der 6 Kandidatengene am Wildtyp-Embryo.....	85
Abb. 3.6.1: RCAS-ArsI infizierte Flügelanlage eines Hühner-Embryos.....	87

9.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Übersicht der 17 Sulfatasen des Menschen.	12
Tabelle 2.1: ISH-Sonden für Sulfatasen.	24
Tabelle 2.2: ISH-Sonden für Col2-Sulf1 ^{tg199} deletierte Gene.	24
Tabelle 2.3: ISH-Sonden für Markergene.	25
Tabelle 2.4: Allgemeine Lösungen	35
Tabelle 2.5: Primer für qPCR, qRT-PCR und RT-PCR.	37
Tabelle 2.6: Primer zur Klonierung der Expressionskonstrukte.	38
Tabelle 2.7: Primer für DNA-Templates der ISH-Sonden.	38
Tabelle 2.8: Primer für inverse PCR der tg199-Mausmutante.	39
Tabelle 2.9: Primer zur Genotypisierung der Mauslinien.	39
Tabelle 3.3.1: Reduziertes Körpergewicht bei doppelt homozygoten Tieren.	61
Tabelle 3.3.2: Verkürzte Knochen bei doppelt homozygoten Sulf1;Sulf2 Tieren.	62
Tabelle 3.3.3: Skelettveränderungen bei postnatalen (\geq P21) Tieren.	65
Tabelle 3.3.4: Skelettveränderungen bei perinatalen (E18,5 - P1) Tieren.	66
Tabelle 3.3.5: Längenmessung der Zonen bei E16,5 Radii.	68
Tabelle 3.3.6: Bestimmung der Zelldichte.	69
Tabelle 3.3.7: Bestimmung der Proliferationsrate.	69
Tabelle 3.4.1: Mandibelphänotyp bei Shh;Sulf1;Sulf2 Dreifachmutanten.	73
Tabelle 3.5.1: Radius- und Sternumlänge von Wildtyp- und transgenen Tieren.	76
Tabelle 3.6.1: Längenmessung der RCAS-ArsI infizierten Flügelanlagen.	87
Tabelle 4.2: Übersicht der Sulf1 und Sulf2 Deletions-Mausmutanten.	95
Tabelle 4.3: Literatur- und Expressionsdaten für die Kandidatengene.	107
Tabelle 8.1: Nachkommen der Sulf1 ^{gt} und Sulf2 ^{gt} Mäusezucht	134

9.4. Publikationsverzeichnis

Haubold B, Kroymann J, Ratzka A, Mitchell-Olds T, Wiehe T. (2002). Recombination and gene-conversion in a 170kb genomic region of *Arabidopsis thaliana*. Genetics 161:1269-1278.

Ratzka A, Vogel H, Kliebenstein DJ, Mitchell-Olds T, Kroymann J. (2002). Disarming the mustard oil bomb. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:11223-11228.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgender Zeitschrift veröffentlicht:

Ratzka A, Kalus I, Moser M, Dierks T, Mundlos S, Vortkamp A. (2008). Redundant function of the heparan sulfate 6-O-endosulfatases Sulf1 and Sulf2 during skeletal development. Dev. Dyn. 237: 339-353.

10. Danksagung

Bei Prof. Dr. Andrea Vortkamp möchte ich mich für das herausfordernde Thema und die kontinuierliche Unterstützung dieser Arbeit, sowie für ihre konstruktive Unterstützung in allen Phasen der Dissertation bedanken.

Prof. Dr. Stefan Mundlos danke ich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen in seiner Arbeitsgruppe und die fruchtbaren Diskussionen innerhalb der Seminare.

Prof. Dr. Thomas Dierks und Dr. Ina Kalus danke ich für die Bereitstellung der Deletions-Mausmutanten und die gute Zusammenarbeit bei diesem Projekt.

Meinen Laborkollegen im Mundlos- und Vortkamp-Lab danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft in Rat und Tat.

Besonders möchte ich mich bei Ulli Wilkening, Wibke Schwarzer, Pablo Villavincencio Lorini, Sigmar Stricker, Mateusz Kolanczyk und Jochen Hecht für die wissenschaftlichen Diskussionen, sowie die schöne Zeit in Berlin bedanken.

Ein besonderer Dank geht an meine Kollegen im Pott und die ehemaligen Berliner OWLer: Manuela Wülling, Harald Ehlen, Lydia Didt-Koziel, Milana Tchinenkova, Sabine Schneider und Conny Kreschel.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder Mathias für den Rückhalt und die ständige Unterstützung über all die Jahre hinweg bedanken.

Ein besonderes Dankeschön geht an Katja und Miriam – Danke!

11. Lebenslauf

12. Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 3.12.2008

(Andreas Ratzka)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema **„Untersuchungen zur Funktion der 6-O-Endosulfatasen, Sulf1 und Sulf2, während der Skelettentwicklung am Mausmodell“** zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Andreas Ratzka befürworte.

Essen, den 3.12.2008

(Prof. Dr. Andrea Vortkamp)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner andern Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den 3.12.2008

(Andreas Ratzka)